

B2

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-032559

(43)Date of publication of application : 09.02.1993

(51)Int.Cl. A61K 37/02
A61K 9/00
A61K 37/30
A61K 37/36
A61K 37/66
A61K 47/34
A61K 47/48

(21)Application number : 03-271743 (71)Applicant : IMPERIAL CHEM IND PLC <ICI>
(22)Date of filing : 22.07.1991 (72)Inventor : CAMBLE ROGER
TIMMS DAVID
WILKINSON ANTHONY J

(30)Priority

Priority number : 90 9016138	Priority date : 23.07.1990	Priority country: GB
90 9018414	23.08.1990	GB
90 9018415	23.08.1990	GB
90 9018416	23.08.1990	GB
90 9018417	23.08.1990	GB
90 9018418	23.08.1990	GB

(54) MEDICINAL COMPOSITION AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a medicinal composition capable of continuously releasing a physiologically active polypeptide contained therein as active ingredient over a long period when put in an aqueous physiological environment.

CONSTITUTION: This medicinal composition contains such as active ingredient as to be formed by covalently bind an acid-stable physiologically active peptide (specifically, human calcitonin, interleukin-2, interferon, or human growth hormone) to a water-soluble polymer such as polyethylene glycol or polypropylene glycol. The composition, when put in an aqueous physiological environment, is capable of releasing the peptide in a single step over a week or longer. The medicinal composition affords a continuous two-step release system consisting of the release by diffusion from the surface of the composition and the release by

decomposition of the constituents of the composition, thus enabling the therapeutically active polypeptide to be continuously released by a single administration to a relevant patient.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-32559

(43)公開日 平成 5 年(1993) 2 月 9 日

(51)IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/02	A D V	8314-4C		
9/00	C	7329-4C		
37/30	A B D	8314-4C		
37/36		8314-4C		
37/66	A D Y H	8317-4C		

審査請求 未請求 請求項の数17(全 94 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-271743	(71)出願人	590000341 インペリアル・ケミカル・インダストリーズ・ビーエルシー IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC イギリス国ロンドン市エスダブリュー1ビル・3ジェイエフ, ミルバンク, インペリアル・ケミカル・ハウス (番地なし)
(22)出願日	平成 3 年(1991) 7 月22日	(72)発明者	ケムブル, ロジャー イギリス国, チェシャー, マックレスフィールド, オールダーレー・パーク (番地その他表示なし)
(31)優先権主張番号	9 0 1 6 1 3 8, 1	(74)代理人	弁理士 八木田 茂 (外 2 名)
(32)優先日	1990年 7 月23日		最終頁に続く
(33)優先権主張国	イギリス (GB)		
(31)優先権主張番号	9 0 1 8 4 1 4, 4		
(32)優先日	1990年 8 月23日		
(33)優先権主張国	イギリス (GB)		
(31)優先権主張番号	9 0 1 8 4 1 5, 1		
(32)優先日	1990年 8 月23日		
(33)優先権主張国	イギリス (GB)		

(54)【発明の名称】 医薬組成物及びその製造方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 水性の生理学的環境に置かれたとき、活性成分である生理学的活性ポリペプチドを長期間に亘って連続的に放出できる該ポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。

【構成】 酸安定性の生理学的活性ペプチド (具体的には、ヒトカルシトニン、インターロイキン-2、インターフェロン及びヒト生長ホルモン) をポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等の水溶性重合体に共有結合させた活性成分を含有する医薬組成物。本組成物水性の生理学的環境に置かれた場合、少くとも1週間に亘って一段階的に該ペプチドを放式できるものである。

【効果】 本医薬組成物は組成物表面からの拡散による放出及び組成物構成成分の分解による放出との連続的二段階放出システムを提供し、患者への一回投与により、治療活性ポリペプチドの長時間、連続的放出を可能にする。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酸安定性の生理学的活性物質を医薬組成物の構成成分から水性生理学的環境中に連続的に放出させるための医薬組成物であって、上記生理学的活性物質は水溶性重合体と共有結合されているポリペプチドであってかつ意図された使用期間中に医薬組成物内で遭遇する条件下で著しく加水分解されないものであること；そして

i) 上記医薬組成物は、水性生理学的環境下に置いた場合、ポリペプチドを水性生理学的環境中に連続的な方式で放出して、少なくとも1週間に亘って、本質的に一段階的である放出形式を与えること；

ii) 上記組成物は、ポリペプチドの放出を2つの連続的段階で行い；第1段階の放出は表面からの拡散によって生起し、第2段階の放出は医薬組成物の構成成分の分解の結果として生起しそして拡散段階と分解により誘導される段階とは時間的に重なり合うことを特徴とし、また、ポリペプチドの放出は少なくとも1週間に亘って生起すること；又は

iii) 上記組成物は水を連続的に吸収し、そして該組成物が分解しかつ実質的に全てのポリペプチドが水性生理学的環境中に放出されるまで、少なくとも1週間に亘って、実質的に一段階的である水吸収形式を与えること；を特徴とする医薬組成物。

【請求項2】 1分子の生理学的活性物質は、3000～8000のDa分子量を有するポリペプチド1個当たり、少なくとも1分子の水溶性重合体を含有する請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 ポリペプチドは自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有する請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】 ポリペプチドは、自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つと、5mg/mlにおいて少なくとも35%の溶液安定度とを有する、自然産生G-CSFの誘導体でありそして、該誘導体においては自然配列の少なくともCys¹⁷がSer¹⁷残基によって置換されておりまた自然配列のAsp¹⁷がSer¹⁷残基によって置換されている請求項3に記載の組成物。

【請求項5】 ポリペプチドは、

- a) 自然配列のGlu¹³の、Arg¹³残基による置換；
- b) 自然配列のLeu¹⁵の、Glu¹⁵残基による置換；
- c) 自然配列のLys²³の、Arg²³残基による置換；
- d) 自然配列のGly²⁶の、Ala²⁶残基による置換；
- e) 自然配列のGly²⁸の、Ala²⁸残基による置換；
- f) 自然配列のAla³⁰の、Lys³⁰又はArg³⁰残基による置換；
- g) 自然配列のLys³⁴の、Arg³⁴残基による置換；
- h) 自然配列のLys⁴⁰の、Arg⁴⁰残基による置換；
- i) 自然配列のPro⁴⁴の、Ala⁴⁴残基による置換；
- j) 自然配列のLeu⁴⁹の、Lys⁴⁹残基による置換；

2

k) 自然配列のGly⁵¹の、Ala⁵¹残基による置換；

l) 自然配列のGly⁵³の、Ala⁵³残基による置換；

m) 自然配列のTrp⁵⁸の、Lys⁵⁸残基による置換；

n) 自然配列のPro⁶⁰の、Ser⁶⁰残基による置換；

o) 自然配列のPro⁶⁵の、Ser⁶⁵残基による置換；

p) 自然配列のPro¹¹¹の、Glu¹¹¹残基による置換；

q) 自然配列のThr¹¹⁵の、Ser¹¹⁵残基による置換；

r) 自然配列のThr¹¹⁶の、Ser¹¹⁶残基による置換；

及び

- 10 s) 自然配列のTyr¹⁶⁵の、Arg¹⁶⁵残基による置換；
から選ばれた少なくとも1つの追加の修飾を有する請求項4に記載の組成物。

【請求項6】 ポリペプチドは

- i) [Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF,
- ii) [Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] ヒトG-CSF,
- iii) [Arg¹¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27,60,65},Ala^{26,28},Lys³⁰] ヒトG-CSF,
- iv) [Arg^{11,40},Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF,
- v) [Arg^{11,23},Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF,
- vi) [Arg^{11,165},Glu¹⁵,Ser^{17,27,60,65},Ala^{26,28},Lys^{30,38}] ヒトG-CSF
- vii) [Arg¹¹,Glu^{15,111},Ser^{17,27,60,65,115,116},Ala^{26,28},Lys³⁰] ヒトG-CSF,
- viii) [Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Arg³⁰] ヒトG-CSF,
- ix) [Ala¹,Thr³,Tyr⁴,Arg^{5,11},Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF
- x) [Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF,
- xi) [Arg¹¹,Ser^{17,27,65}] ヒトG-CSF,及び
- 30 xii) [Ser^{17,27,65}] ヒトG-CSF

から選ばれる請求項4又は5に記載の組成物。

【請求項7】 ポリペプチドは G-CSF、ヒトカルシトニン、インターロイキン-2、インターフェロン及びヒト生長ホルモンから選ばれる請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項8】 水溶性重合体はポリエチレングリコール又はポリプロピレングリコール単独重合体、ポリオキシエチル化ポリオール又はポリビニルアルコール（上記単独重合体はその一方の端部がアルキル基によって置換されているか又は置換されていないものである）から選ばれる請求項1～7のいずれかに記載の組成物。

【請求項9】 水溶性重合体は非置換ポリエチレングリコール、モノメチルポリエチレングリコール及びポリオキシエチル化グリセリンから選ばれる請求項8に記載の組成物。

【請求項10】 水溶性重合体は1000～15,000の分子量を有する請求項8又は9に記載の組成物。

【請求項11】 生理学的活性物質は、モノメチルポリエチレングリコールと共有結合されたかつプレシークエンスメチオニンを有するか又は有していない[Arg¹¹,Se

【請求項1】 ヒトG-CSFでありそして上記モノメチルポリエチレングリコールは2000～5000の分子量を有する請求項1～6及び8～10のいずれかに記載の組成物。

【請求項12】 医薬組成物の構成成分と生理学的活性物質とをこれらに対する有機溶剤中に溶解させるか、又は、医薬組成物の構成成分と生理学的活性物質とを有機媒体又は水性媒体中に均一に分散させ、ついで乾燥させそして動物体内に挿入するか又は動物体内に注入するのに適当な組成物に製剤することを特徴とする、請求項1～11のいずれかに記載の医薬組成物の製造方法。

【請求項13】 生理学的活性物質を、少なくとも25モル%の乳酸単位と75モル%までのグリコール酸単位とを有するポリラクチドからなるマトリックス中に配合すること及び更に、生理学的活性物質と医薬組成物の構成成分との均密な固体混合物を熔融加工することにより、生理学的活性物質と医薬組成物の構成成分とを均一に混合することを特徴とする、医薬組成物の構成成分がポリラクチドからなる請求項1～11のいずれかに記載の医薬組成物の製造方法。

【請求項14】 請求項1～11のいずれかに記載の医薬組成物を哺乳動物に投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたポリペプチドの有効量を供与すること、そして、上記ポリペプチドは自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有するものであることを特徴とする、哺乳動物に造血治療を施す方法。

【請求項15】 請求項1～11のいずれかに記載の医薬組成物を哺乳動物に投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたポリペプチドの有効量を供与すること、そして、上記ポリペプチドは自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有するものであることを特徴とする、哺乳動物の白血病性細胞の増殖の抑制方法。

【請求項16】 請求項1～11のいずれかに記載の医薬組成物を哺乳動物に投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたインターロイキン-2の有効量を供与することを特徴とする、哺乳動物の新生物又は免疫不全症の処置方法。

【請求項17】 請求項1～11のいずれかに記載の医薬組成物を哺乳動物に投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたインターフェロンの有効量を供与することを特徴とする、哺乳動物の新生物又はウイルスの処置方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は生理学的活性ポリペプチドを含有する医薬組成物であって、該組成物を水性生理学的環境(aqueous physiological-type environment)

(後に定義する)中に置いた場合に、ポリペプチドを長期間に亘って連続的に放出する医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術及び解決すべき課題】 ある種の医薬を一回

の投与後、長期間に亘って連続的に放出させることは、臨床的实施において大きな実際の利点を有し得ることは以前から知られており、多数の臨床的に有用な医薬を投与後、長期間に亘って放出させるための組成物がすでに開発されている(経口投与後については、例えば、米国、ペンシルバニア州、イーストン、Mack Publishing社発行、Remington 著、“Pharmaceutical Sciences”、第15版; 1975、第1618～1631頁参照; 非経口投与後については、上記文献の第1631～1643頁参照; 局所投与後については、英国特許第1,351,409号明細書参照)。非経口投与を行うための適当な方法は、医薬を含有する固体、例えばベレット又はフィルムの皮下注射又は注入(implantation)であり、多種のかかる注入装置が知られている。特に、多くの医薬について、医薬を長期間、放出させるのに適当な挿入装置又は注入可能な微細粒子懸濁物は、医薬を生分解性重合体中に封入することにより、あるいは、医薬をかかる重合体のマトリックス中に分散させることにより得ることができ、その結果、医薬は重合体マトリックスの分解が進むにつれて放出される。

【0003】 持続放出型製剤(sustained release formulation)で使用するのに適当な生分解性重合体は周知であり、かかる重合体としてポリエステルが挙げられる; このポリエステルは、水性生理学的環境下に置かれた場合、加水分解により徐々に分解される。使用されている特定のポリエステルはヒドロキシカルボン酸から誘導されたものであり、多くの公知技術は、 α -ヒドロキシカルボン酸、特にラセミ形及び光学活性形の乳酸及びグリコール酸から誘導された重合体及び共重合体に向けられている; 例えば米国特許第3,773,919号及び同第3,887,699号明細書; Jackanicz 等、“Contraception”、1973、8、227～234; Anderson等、同上文献、1976、11、375～384; Wise等、“Life Sciences”、1976、19、867～874; Woodland等、“Journal of Medicinal Chemistry”、1973、16、897～901; Yolles等、“Bulletin of Parenteral Drug Association”、1976、30、306～312; Wise等、“Journal of Pharmacy and Pharmacology”、1978、30、686～689及び1979、31、201～204; 参照。

【0004】 医薬の“持続的な”(“sustained”)又は“長期間の”(“extended”)放出は連続的であるか又は非連続的であることを理解すべきである。例えば、英国特許第1,325,209号明細書に記載されることポリラクチド重合体からのポリペプチドの放出の場合には、その放出前に、ポリペプチドが放出されないかなりの長さの誘導期間があるか、又は、二段階的であり(biphasic)、そして、このポリペプチドの放出は、若干のポリペプチドが放出される初期期間と、ポリペプチドが少しだけ放出されるか又は全く放出されない第2の期間と、ポリペプチドの大部分が放出される第3の期間とからな

る。これに対して、本発明の目的は、場合により存在する比較的短い初期誘導期間は別として、ポリペプチドが連続的に放出されるかつポリペプチドが少ししか又は全く放出されない期間を伴うことのない、ポリペプチドの組成物を提供することにある。本明細書においては、

“連続的放出” (“continuous release”) という用語は、本質的に一段階的な(monophasic)放出形式(release profile) を述べるためにのみ使用される；しかしながら、この連続的放出形式は、医薬の累積放出量を時間の関数としてプロットした場合、変曲点(point of inflection) は有し得るが、“プラトー” 段階 (“plateau” phase) は確実に有していない。

【0005】本出願人の欧州特許第58,481号明細書には、酸安定性ポリペプチドの本質的に一段階的放出を可能にする、連続放出型医薬組成物が記載されている。この組成物は、一般的には、乳酸単体の重合体、乳酸とグリコール酸の共重合体、上記の重合体の混合物、上記の共重合体の混合物又は上記の重合体と共重合体の混合物であるポリラクチドと、意図する使用期間中に組成物内で遭遇する条件下で著しく加水分解されることのない酸安定性の(後に定義する)ポリペプチドとからなる；この組成物は、水性生理学的環境(後に定義する)中に置いた場合、ポリペプチドを水性生理学的環境中に連続的な形式で放出する；この組成物は本質的に一段階的な放出形式であってかつ変曲点は有し得るが、“プラトー” 段階は確実に有していない放出形式を、少なくとも1週間に亘って与える。

【0006】前記したごとく、欧州特許公告第58,481号明細書は、同明細書に記載の製剤中で遭遇する条件下で安定なポリペプチドの製剤に関する。しかしながら、自然産生(native) [Met¹] ヒトG-CSF のときある種のポリペプチドはかかる条件下においては本来、不安定であり、ある種の不安定性の問題、例えば、特に、凝集する傾向を有する。本発明は水溶性重合体との結合により、製剤(depot) 内で遭遇する条件下で不安定であり従って適切に放出されないある種のポリペプチドに存在する不安定性の問題を克服し得るか又は少なくとも改善し得るという発見に基づくものである。本発明は、また、生理学的に活性なポリペプチドが水溶性重合体に共有結合している、生理学的活性物質の使用により、連続放出型製剤組成物中の対応する非結合ポリペプチドと比較して、放出形式が改善されるという発見に基づくものである。

【0007】最近、インターロイキン-2の制御放出型(controlled release)微小球製剤の開発について Hora M.S. 等により Proceed. Intern. Sym. Control. Rel. Bioact. Mater. 16, (1989), No 268, 509 ~ 510頁に発表されている。Hora等によれば、ウシ胎児血清の存在下でポリエチレングリコール(PEG) と共有結合させた、ペギル化(ポリエチレングリコール化) された(pegylated) インターロイキン-2 (IL-2) (以下においてはPEG I

IL-2と称する) をポリ(DL-ラクチド-コグリコライド(DL-Lactide-co-glycolide) 微小球から放出させた場合には三段階放出形式(triphasic release pattern) が得られること及び5~15日間の遅れ(lag) 又は誘導期間に遭遇することが示されている。Hora M.S. 等はヒト血清アルブミン(HSA) を使用してPEG IL-2の湿潤と再溶解を改善することを試みることにより、上記の問題の解決を計った。しかしながら、この試みにより、別の問題、すなわち、溶解タンパク質(solubilising protein)の存在という問題が生じた。医薬組成物中にかかるタンパク質が存在することは、特に、このタンパク質によって有害な副反応が生じかつ分析精度を低下させるという理由で不利なことである。

【0008】更に、Hora M.S. 等による前記文献では、ポリ(DL-ラクチド-コグリコライド) 重合体の溶解特性(特に、重合体がベンゼンに可溶性であるか又は不溶性であるかという点) 及び多分散性(polydispersibility) (後に定義する) が規定されていない。これらの要因が記載されていない場合及び製剤方法が記載されていない場合には、報告された研究を追試することができず従って前記文献は利用することができない。更に、上記文献では、ポリエチレングリコールの分子又はペギル化(ポリエチレングリコール化) (pegylation)の程度が規定されていないことも注目される；これらの要因は両者共、発表された研究を追試する場合に必要なものである。

【0009】Hora M.S. 等によってペギル化IL-2を用いて得られた連続的放出についての結果が不良であることから見て、本発明に従って水溶性重合体と共有結合した(covalently conjugated) 生理学的活性ポリペプチドを使用することにより、良好な放出形式が得られることは全く驚くべきことである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明の第1の要旨によれば、酸安定性の生理学的活性物質を医薬組成物の構成成分から水性生理学的環境中に連続的に放出させるための医薬組成物であって、上記生理学的活性物質は水溶性重合体と共有結合されているポリペプチドであってかつ意図された使用期間中に医薬組成物内で遭遇する条件下で著しく加水分解されないものであること；そして

i) 上記医薬組成物は、水性生理学的環境中に置いた場合、ポリペプチドを水性生理学的環境中に連続的な方式で放出して、少なくとも1週間に亘って、本質的に一段階的である放出形式を与えること；

ii) 上記組成物は、ポリペプチドの放出を2つの連続的段階で行い；第1段階の放出は表面からの拡散によって生じ、第2段階の放出は医薬組成物の構成成分の分解の結果として生じそして拡散段階と分解により誘導される段階とは時間的に重なり合うことを特徴とし、また、ポリペプチドの放出は少なくとも1週間に亘って生

起すること；又は

iii)上記組成物は、水を連続的に吸収し、そして該組成物が分解しかつ実質的に全てのポリペプチドが水性生理学的環境中に放出されるまで、少なくとも1週間に亘って、実質的に一段階的である水吸収形式を与えること；を特徴とする医薬組成物が提供される。

【0011】本発明の別の要旨によれば、本発明の医薬組成物を哺乳動物に投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたポリペプチドの有効量を供給する(deliver)こと、そして、上記ポリペプチドは自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有するものであることを特徴とする、哺乳動物に造血治療を施す方法が提供される。

【0012】本発明の更に別の要旨によれば、本発明の医薬組成物を哺乳動物に投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたポリペプチドの有効量を供与すること、そして、上記ポリペプチドは自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有するものであることを特徴とする、哺乳動物の白血病性細胞の増殖の抑制方法が提供される。

【0013】本発明の医薬組成物をヒトに投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたヒトカルシトニンの有効量を供与することによりヒトの骨粗しょう症又はページェット病(Paget's disease)を治療し得る。

【0014】本発明の更に別の要旨によれば、本発明の医薬組成物を哺乳動物に投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたインターロイキン-2の有効量を供与することを特徴とする、哺乳動物の新生物又は免疫不全症の処置方法が提供される。

【0015】本発明の更に別の要旨によれば、本発明の医薬組成物を哺乳動物に投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたインターフェロン(好ましくはインターフェロン α 、特に、インターフェロン α_2)の有効量を供与することを特徴とする、哺乳動物の新生物又はウイルスの処置方法が提供される。

【0016】本発明の医薬組成物をヒトに投与し、それによって、水溶性重合体に共有結合されたヒト生長ホルモンの有効量を供与することにより、ヒトの生長を促進し得る。

【0017】本発明の更に別の要旨によれば、医薬組成物の構成成分と生理学的活性物質とをこれらに対する有機溶剤中に溶解させるか、又は、医薬組成物の構成成分と生理学的活性物質とを有機媒体又は水性媒体中に均一に分散させ、ついで乾燥させそして動物体内に挿入するか又は注入するのに適当な組成物に製剤することを特徴とする本発明の医薬組成物の製造方法が提供される。

【0018】かかる組成物は挿入(implanation)するのに適当な固体、好都合であるためには、固体円筒形デポット(depot)に製剤するか、又は、例えば微粉碎(commi-
nution)又は超微粉碎(micronisation)により、注入(i-

njection)するのに適当な多粒子形製剤(multiparticulate form)に製剤し得る。多粒子形製剤は注入するために溶液又はエマルジョンに調製し得る。調剤は例えば水性媒体中で、又は、アラキス(arackis)油のごとき油又はクレモフォル(Cremophor)(Martindale, "The Extra Pharmacopoeia", 第28版、第694頁参照)中で行い得る。注入用ビヒクルとしてはカルボキシメチルセルローズが挙げられる(Martindale, "The Extra Pharmacopoeia" 第28版、第947頁参照)。

10 【0019】分散体を形成させる場合には水性媒体を使用することが好ましい。

【0020】この方法は挿入のための棒状、球状、フィルム状又はベレット状の医薬を製造するのに使用し得る。医薬組成物の構成成分は例えばポリラクチド(後に定義する)であることができ、かつ、平均して少なくとも2つの同一の単量体単位を有するブロックであることが好都合な、少なくとも25モル%、好ましくは40モル%の乳酸単位と75モル%までのグリコール酸単位とを有することが有利であり得る。ポリラクチドはベンゼンに可溶性でかつ0.3以下の固有粘度(ベンゼン100 ml中のポリラクチド1 gの溶液)を有するか又はベンゼンに不溶性でかつ4以下の固有粘度(クロロホルム又はジオキサン100 ml中のポリラクチド1 gの溶液)であることが好ましい。

【0021】本発明の方法は例えば酢酸(好ましくは氷酢酸)のごとき凍結乾燥可能な共通溶剤を使用して、凍結させついで凍結乾燥させることにより行うことが好ましい。医薬組成物の構成成分(material of the composition)とこれに対する有機溶剤とからなる第1溶液及び生物学的活性物質とこれに対する有機溶剤とからなる第2溶液を調製しついでこの2つの溶液を混合することが好都合である。使用する溶剤は第1と第2の溶液に共通であることが好ましくそして凍結乾燥し得るものであることが好都合である。この方法は欧州特許第58,481号明細書に記載されている。しかしながら、所望ならば、医薬組成物の構成成分と生物学的活性物質との均密な固体混合物を熔融加工することにより医薬組成物を調製し得る。

【0022】本発明の別の要旨によれば、生理学的活性物質を、少なくとも25モル%、好ましくは、40モル%の乳酸単位と75モル%までのグリコール酸単位とを有するポリラクチドからなるマトリックス中に配合すること及び更に、生理学的活性物質と医薬組成物の構成成分との均密な固体混合物を熔融加工することにより、生理学的活性物質と医薬組成物の構成成分とを均一に混合することを特徴とする、医薬組成物の構成成分がポリラクチドからなる医薬組成物の製造方法が提供される。

【0023】一般的説明

A. 生理学的活性物質

50 一般に、ポリペプチドの分子量が大きければ大きい程、

最適な放出形式を得るためにポリペプチドに結合させるべき水溶性重合体の数も大きくなる。少なくとも1モルの水溶性重合体をDa分子量が8000までのポリペプチドに結合させることが好ましく、そして、少なくとも1モルの水溶性重合体を、3000~8000Da、特に4000~6500Daの分子量のポリペプチドの各々について使用することが好ましい。一分子のポリペプチドは所望の水準の生理学的活性の保留と一致するような多数の分子の水溶性重合体を担持し得る。実際に、この条件に従う限り、ポリペプチドに最大数の水溶性重合体を結合させることが有利である。所与のポリペプチド上に水溶性重合体を結合させるための多数の部位が存在する場合には、結合を最大限に行うことにより化合物の不均質な混合物が得られることは理解されるであろう。従って、例えば、ポリペプチドが水溶性重合体を結合させるための部位を4個有する場合には、得られるポリペプチドと水溶性重合体の最大の比率は例えば3.9以下であり得る。

【0024】A.1.ポリペプチド

本発明の医薬組成物中で使用される生物学的活性物質は、水溶性重合体に共有結合されたヒトカルシトニン、インターロイキン-2、ヒト生長ホルモン又はインターフェロン α 、例えばインターフェロン α_2 のごときインターフェロンであり得るか又は、好ましくは、水溶性重合体に共有結合されたポリペプチドであってかつ自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つ及び好都合には、自然産生G-CSFのアミノ酸配列の一部又は全部を有するポリペプチドであり得る。このペプチドは遊離のチオール基を有していないことが好ましく、従って、天然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有するポリペプチドについては、17位のシステインが存在しないか又はアラニン又は好ましく例えばセリンのごとき他のアミノ酸によって置換されていることが好ましいであろう。

【0025】A.1.1. G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有するポリペプチド

自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有するポリペプチドを使用することを希望する場合には、かかる性質を有する任意の誘導体を使用し得るが、使用するポリペプチドは本出願人の欧州特許出願第91303868.3号明細書に記載されるG-CSF誘導体であることが有利である；同明細書には改善された溶液安定度(solution stability)を有するG-CSF誘導体に記載されている。すなわち、上記欧州特許出願第91303868.3号明細書には、自然産生G-CSFの生物学的活性の少なくとも1つを有するかつ5mg/mlにおいて少なくとも35%の溶液安定度(後に定義する)を有する、自然産生G-CSFの誘導体に記載されている；この誘導体においては自然配列の少なくともCys¹⁷がSer¹⁷残基によって置換されており、また、自然配列のAsp¹⁷がSer¹⁷残基によって置換されている。

【0026】上記の自然産生G-CSFの誘導体は下記のものから選ばれた追加の修飾(modification)の少なくとも1つを有することが好ましい：

- a) 自然配列のGlu¹¹の、Arg¹¹残基による置換；
 - b) 自然配列のLeu¹⁵の、Glu¹⁵残基による置換；
 - c) 自然配列のLys¹³の、Arg¹³残基による置換；
 - d) 自然配列のGly⁶の、Ala²⁶残基による置換；
 - e) 自然配列のGly⁸の、Ala²⁸残基による置換；
 - f) 自然配列のAla³⁰の、Lys³⁰またはArg³⁰残基による置換；
 - g) 自然配列のLys³⁴の、Arg³⁴残基による置換；
 - h) 自然配列のLys⁴⁰の、Arg⁴⁰残基による置換；
 - i) 自然配列のPro⁴⁴の、Ala⁴⁴残基による置換；
 - j) 自然配列のLeu⁴⁹の、Lys⁴⁹残基による置換；
 - k) 自然配列のGly⁵¹の、Ala⁵¹残基による置換；
 - l) 自然配列のGly⁵¹の、Ala⁵⁵残基による置換；
 - m) 自然配列のTrp⁵⁸の、Lys⁵⁸残基による置換；
 - n) 自然配列のPro⁶⁰の、Ser⁶⁰残基による置換；
 - o) 自然配列のPro⁶⁵の、Ser⁶⁵残基による置換；
 - p) 自然配列のPro¹¹¹の、Glu¹¹¹残基による置換；
 - q) 自然配列のThr¹¹⁵の、Ser¹¹⁵残基による置換；
 - r) 自然配列のThr¹¹⁶の、Ser¹¹⁶残基による置換；及び
 - s) 自然配列のTyr¹⁶⁵の、Arg¹⁶⁵残基による置換；
- 【0027】(b)~(s)から選ばれた追加の修飾の少なくとも1つを存在させることが好ましいが、(b)、(d)、(e)、(f)、(n)及び(o)から選ばれた追加の修飾の少なくとも1つ、特に追加の修飾(o)を存在させることが特に好ましい。追加の修飾が下記に示すものの少なくとも1つからなることがより好ましい：
- i) 自然配列のGln¹¹,Pro^{60,65}の、Arg¹¹,Ser^{60,65}による置換；
 - ii) 自然配列のAla¹¹¹,Thr^{115,116}の、Glu¹¹¹,Ser^{115,116}による置換；
 - iii) 自然配列のGln¹¹,Trp⁵⁸,Tyr¹⁶⁵の、Arg^{11,165},Lys⁵⁸による置換；
 - iv) 自然配列のLeu¹⁵,Gly^{6,28}、Ala³⁰の、Glu¹⁵,Ala^{26,28},Lys³⁰による置換；又は
 - v) 自然配列のPro⁴⁴,Leu⁴⁹,Gly^{51,55},Trp⁵⁸の、Lys^{49,58},Ala^{44,51,55}による置換；
- 【0028】追加の修飾は、また、下記のもの少なくとも1つからなることが好ましい：
- vi) 自然配列のLeu¹⁵,Gly^{6,28},Ala³⁰の、Glu¹⁵,Ala^{26,28},Arg³⁰による置換；
 - vii) 自然配列のPro⁶⁵の、Ser⁶⁵による置換；
 - viii) 自然配列のPro^{60,65}の、Ser^{60,65}による置換；又は
 - ix) 自然配列のGlu¹¹,Pro⁶⁵の、Arg¹¹,Ser⁶⁵による置換；

【0029】従って、所望ならば、上記の修飾を、自然

産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも一つを有する任意のポリペプチド中に導入して、ポリペプチド分子の溶液安定度を改善することができる。例えば、上記の修飾は1つ又はそれ以上の残基の同一性又は位置(例えば置換、末端及び内部付加及び削除)の点で、自然産生G-CSFsについて本明細書中で規定したものとアミノ酸配列の異なる、上記ポリペプチドに適用し得る。例えばかかるポリペプチドは例えば削除(欠失)(deletion)により前方短縮された(foreshortened)もの;又は加水分解に対してより安定なもの(及び、従って、天然に産生するものに比べて、より顕著な又はより長い持続効果を有するもの);又はO-グリコシル化(O-glycosylation)のための1個又はそれ以上の潜在的部位を削除するために(その結果、酵母産生生成物に対するより高い活性が得られる)変更したもの;1個又はそれ以上のシステイン残基が削除されているか又は例えばアラニン又はセリン残基によって置換されておりそして微生物系から活性な形でより容易に単離されるもの;又はフェニルアラニンによって1個又はそれ以上のトリシン残基が置換されているかつターゲット細胞上のヒトG-CSFリセプターに多かれ少なかれ容易に結合し得るものが挙げられる。前記欧州特許出願第91303868.3号明細書において提案されている修飾は、例えば、自然配列のCys¹⁷がSer¹⁷によって置換されているもの、又は、自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有することが知られている、上記G-CSFの対立遺伝子的変種(allelic variant)及びその同族体、例えば、PCT特許公告WO87/01132号明細書、欧州特許公告第243,153号明細書、欧州特許公告第256,843号明細書、欧州特許公告第272,603号明細書、“Biochemical and Biophysical Research Communications”、(1989), Vol.159, No.1, 103~111頁、Kuga T. 他及び米国特許第4,904,584号明細書に記載されているものに適用し得る。

【0030】かかるG-CSF誘導体について試験を行った結果から、これらの誘導体は、対応する非修飾ポリペプチドよりすぐれた溶液安定度を有しており、しかも、生物学的活性において顕著な差異を有していないか又は改善された生物学的活性を有することが認められた。

【0031】溶液安定度は1mq/ml、5mq/ml及び/又は10mq/mlの初期濃度を有する、G-CSF誘導体の磷酸緩衝溶液(phosphate buffered saline)中の溶液を37℃で14日間放置した後に溶液中に溶解しているG-CSF誘導体の%を測定することにより決定される。溶液安定度の測定法は後記参考例26に詳細に記載されている。本発明の医薬組成物中で使用されるG-CSF誘導体は初期濃度5mq/mlの溶液においては少なくとも35%の溶液安定度を有することが好都合であり、少なくとも50%の溶液安定度を有することが有利であり、少なくとも75%の溶液安定度を有することが好ましいであろう。本発明で使用するポリペプチドは初期濃度10mq/mlの溶液においては少な

くとも75%、特に、少なくとも85%の溶液安定度を有することが好ましい。

【0032】本発明の医薬組成物中で使用されるG-CSF誘導体は前記したとき追加の修飾(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)又は(ix)の一つ、好ましくは、追加の修飾(i)、(ii)、(vi)、(vii)、(viii)又は(ix)の1つ、特に、追加の修飾(ii)、(iv)、(vi)、(vii)、(viii)又は(ix)の1つを有するように選択することが好ましい。

10 【0033】溶液安定度が良好であるため、本発明の医薬組成物中で使用するのに特に好ましいG-CSF誘導体としては下記のもの挙げられる:

[Arg¹,Ser^{17,27,60,65}] G-CSF;

[Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] G-CSF;

[Arg¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27,60,65},Ala^{26,28},Lys³⁰] G-CSF

[Arg^{1,23},Ser^{17,27,60,65}] G-CSF

[Arg^{1,34},Ser^{17,27,60,65}] G-CSF

[Arg^{1,40},Ser^{17,27,60,65}] G-CSF

[Ala¹,Thr²,Tyr⁴,Arg^{5,11},Ser^{17,27,60,65}] G-CSF

20 [Arg¹,Glu^{15,111},Ser^{17,27,60,65,115,116},Ala^{26,28},Lys³⁰] G-CSF

[Arg^{1,165},Glu¹⁵,Ser^{17,27,60,65},Ala^{26,28},Lys^{30,58}] G-CSF

[Arg¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27,60,65},Ala^{26,28,44,51,55},Lys^{30,49,58}] G-CSF

[Arg^{1,165},Glu^{15,111},Ser^{17,27,60,65,115,116},Ala^{26,28,44,51,55},Lys^{30,49,58}] G-CSF

[Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Arg³⁰] hu G-CSF

30 【0034】溶液安定度がすぐれておりかつ良好な比活性(specific activity)を有するため、本発明の医薬組成物中で使用するのに特に好ましいG-CSF誘導体としては下記のもの挙げられる:

i) [Arg¹,Ser^{17,27,60,65}] G-CSF,

ii) [Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] G-CSF,

iii) [Arg¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27,60,65},Ala^{26,28},Lys³⁰] G-CSF,

iv) [Arg^{1,40},Ser^{17,27,60,65}] G-CSF,

v) [Arg^{1,23},Ser^{17,27,60,65}] G-CSF,

vi) [Arg^{1,165},Glu¹⁵,Ser^{17,27,60,65},Ala^{26,28},Lys^{30,58}] G-CSF

40 vii) [Arg¹,Glu^{15,111},Ser^{17,27,60,65,115,116},Ala^{26,28},Lys³⁰] G-CSF,

viii) [Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Arg³⁰] G-CSF,

ix) [Ala¹,Thr²,Tyr⁴,Arg^{5,11},Ser^{17,27,60,65}] G-CSF,

x) [Ser^{17,27,60,65}] G-CSF,

xi) [Arg¹,Ser^{17,27,65}] G-CSF, 及び

xii) [Ser^{17,27,65}] G-CSF

50 これらの内、(i)、(ii)、(iii)、(vi)、(vii)、(viii)、(x)、(xi)及び(xii)が最も好ましい。

【0035】これらの後者のヒトG-CSF誘導体はすぐれた溶液安定度を示すばかりでなしに、自然産生ヒトG-CSFに比べて改善された比活性を有する。

【0036】本発明のポリペプチド中にプリシーケンス (presequence) メチオニンを存在させるかあるいは存在させないことができるが、これを存在させることが好都合である。

【0037】本発明の医薬組成物中で使用される G-CSF 誘導体の製造に関して、下記 i) ~ vii)、すなわち、
i) プロモーター及び適当である場合にはこのプロモーターに対するオペレーター、例えば trpプロモーター又は T7A3プロモーター。T7A3プロモーターはバクテリオファージ T7 の A3プロモーターである [Dunn J. J. 及び Studier F. W., "J. Mol. Biol." 166, 477~535(1983) 参照]。バクテリオファージ T7 DNA の完全なヌクレオチド塩基配列及び T7 遺伝要素 (genetic element) の位置は上記文献に記載されている；

ii) リボソーム結合部位配列、例えば trp リーダーリボソーム結合部位配列；

iii) 発現させるべき遺伝子に対するクローニング部位；

iv) aT4 転写終結配列 (SEQ ID No51 及び図 6 参照)；

v) cer 配列 (Summer D 等, MGG, 201, P334-338, 1985 参照)；
vi) テトラサイクリンリプレッサー遺伝子 (Tet R)；
vii) テトラサイクリン耐性遺伝子 (Tet A)；
viii) 多重制限酵素配列 (multiple restriction enzyme sequence)；

からなる、PAT153に基づく産生ベクター (production vector) を使用することが有利であることが認められた。

【0038】SEQ ID No47 には EcoRI 制限エンドヌクレアーゼ部位 (ヌクレオチド 1-6)、A3プロモーター配列 (ヌクレオチド 7~52)、trp リーダーリボソーム結合部位配列 (ヌクレオチド 53~78) 及び翻訳開始コドン (ヌクレオチド 79~81) を包含する塩基配列が記載されている。

【0039】本発明の G-CSF 誘導体 (先に定義) を発現することのできる宿主を増殖培地で培養しそして培養中に酵母エキスを含有する補充液 (supplement) を増殖培地に添加することが有利である。酵母エキスを含有する補充液の添加は、培養の開始後、所定の時期に開始することが好ましい。酵母エキスを含有する補充液の添加速度は増殖培地が酵母エキスを消費した状態になることのないような速度であることが好ましい。このことは産生ベクターを T7A3プロモーターと共に使用した場合に特に有利である。

【0040】前記で定義したとき G-CSF の誘導体についてコードする遺伝物質 (genetic material) を担持する組換え体ベクターを用いて形質転換された宿主を、G-CSF 誘導体の蓄積 (accumulation) を改善するのに十分な量のロイシン及び/又はスレオニンの存在下で培養する

ことも有利であり得る。例えば、産生ベクターを trp プロモーターと共に使用した場合には、この発酵 (又は培養) (fermentation) をロイシンの存在下で行うことが特に好ましい。

【0041】G-CSF 誘導体の精製は PCT 特許出願公告第 W087/001132 号明細書に記載の方法で行い得るが、上記 PCT 公告明細書には、同明細書に記載の方法で調製された G-CSF 同族体から表面活性剤 (detergent)、特に、塩の形の N-ラウロイルサルコシン [例えば、サルコシル (Sarkosyl)] を除去することは記載されていない。表面活性剤の除去はリン酸緩衝溶液 (phosphate buffered saline) (pH=7.2~7.5) 中に行うことが好ましい。緩衝溶液は等張食塩水 (isotonic saline) から好都合に調製することができ、例えば、参考 3 に記載するとき組成を有する。この点に関して、他の緩衝液は、表面活性剤の除去、特に、N-ラウロイルサルコシン (塩の形) の除去が遅くかつより多量のタンパク質が沈澱するという理由で余り好ましくないことが認められた。タンパク質の沈澱を増大させることなしに除去効率改善されるという理由から、好ましくはこの工程でダイアフィルタレーション (透析濾過) (diafiltration) を行うことが更に好ましい。例えばダイアフィルタレーションは慣用の拡散透析 (diffusion dialysis) に対して好ましいことが認められた。更に、表面活性剤の濃度、特に、塩の形の N-ラウロイルサルコシン (例えばサルコシル) の濃度を、クロマトグラフィー中の分解能 (resolution) を保持しながら、1%以下に低下させ得ることが認められた。初期表面活性剤濃度を低下させることにより表面活性剤の除去が促進され、従って、クロマトグラフィー中の分解能の保持に一致する、最少の表面活性剤濃度、例えば N-ラウロイルサルコシン (塩の形、例えばサルコシル) 濃度を使用することが好ましい。表面活性剤、例えば N-ラウロイルサルコシン (塩の形)、例えばサルコシルの特定の濃度は例えば 0.8~0.2%、好ましくは 0.5~0.2%、特に約 0.3% である。

【0042】上記したことの他に、N-ラウロイルサルコシン (塩の形)、例えばサルコシルのごとき表面活性剤を除去することにより、産生物の評価を複雑にする痕跡のタンパク分解活性 (proteolytic activity) を活性化することが認められた。更に、ダイアフィルタレーションによる表面活性剤の除去後、好都合にはダイアフィルタレーションにより、好ましくは透析により、実質的なタンパク質の加水分解の生ずる前に pH を 7.0 以下に低下させた場合には、上記タンパク分解活性を著しく減少させ、排除することさえできることが認められた。例えば、痕跡のタンパク分解活性の減少又は除去は、7.0 以下の pH であるが、ポリペプチドの顕著な加水分解を回避するのに十分な高さの pH で行い得る。この pH は 6.0~4.5 であることが有利であり、好ましくは 5.8~5.0、特に、約 5.4 である。本発明のこの態様の別の利点は、こ

のpHの低下を行うことにより、大腸菌混入物及び／又は分解された又は不正確に折りたたまれた (incorrectly folded) タンパク質を沈澱させ得ることである。精製の際にサイズ排除クロマトグラフィー工程を包含させることが好ましい；その理由はこれを行わない場合には、タンパク質の加水分解による分解の問題が増大するのに対し、本発明のこの態様においては、タンパク質の除去を困難にせしめる、かかるタンパク質の分解が減少することにある。

【0043】上記の方法の他に、G-CSF又はその誘導体の溶液安定度を向上させることにより、抽出操作が実質的に単純化される。例えば、前記で定義したとき本発明の活性誘導体をその封入体 (包含体) (inclusion body) から抽出する方法は、この封入体を表面活性剤、特に、塩の形のN-ラウロイルサルコシン (例えばサルコシル) 中に懸濁させ、2) 酸化し、3) 表面活性剤を除去し、ついで4) 表面活性剤を除去して得られた溶液を、高められた温度例えば30〜45°C、有利には34〜42°Cに保持し、それによって、混入バクテリアタンパク質、生成物オリゴマー及び／又は分解生成物を沈澱させることからなる。上記の溶液は前記したとき高められた温度で6〜24時間、有利には8〜18時間、好ましくは10〜14時間、特に、約12時間、保持することが好都合である。

【0044】抽出は、例えば、宿主細胞を溶解し (lyse) ついで遠心分離を行って封入体を例えばベレットの形で得ることにより行い得る。ついで封入体を表面活性剤、例えば塩の形のN-ラウロイルサルコシン (例えばサルコシル)、好ましくは、1〜3%、特に、約2%の、塩の形のN-ラウロイルサルコシン (例えばサルコシル) 中に懸濁させ得る。表面活性剤中の懸濁物をついで硫酸銅 (CuSO₄) の存在下で酸化しついで遠心分離し得る。封入体を洗浄することが可能な場合には、例えばデオキシコール酸塩より尿素を使用することが好ましい。

【0045】上記の抽出法によれば、例えばサイズ排除カラム (size exclusion column) を使用する必要が排除されるため、生産方法が単純化され得る。更に、熱処理工程からの生産物の回収率が高いことは、G-CSF誘導体の改善された溶液安定度によってもたらされる利点の一つであると考えられる。実際に、溶液安定度が大きければ大きい程、タンパク質は上記の新規な抽出法に対してより適するものになる。従って例えば、この抽出法を10 mg/mlにおいて少なくとも85%の溶液安定度を有するG-CSFの誘導体の抽出に適用することが好ましい。既知の同族体 [Met¹, Ser¹⁷] G-CSFを上記の抽出法により抽出した場合、rpHPLCは、1 mg/mlの全タンパク質を含有する滞留物 (retentate) を熱処理した後に、溶液中に所望の生成物が40%しか残留していないことを示した。3 mg/mlの全タンパク質濃度においては、前記同族体は19%しか溶液中に残存していないことを示した。

【0046】A.1.2 他のポリペプチド

ヒトカルシトニン¹は英国特許第1,270,595号明細書に記載されており、例えばペプチド合成又は組換え技術によって調製し得る (例えば、欧州特許公告第77,689; 70,675; 95,351; 197,794; 201,511 及び308,067号明細書及び米国特許第3,891,614 及び3,926,938号明細書参照)。水溶性重合体に共有結合されたヒトカルシトニンのペプチド合成による製造は、水溶性重合体を共有結合させるための、単一のリシン残基上の遊離のN-末端アミノ基及び別の遊離アミノ基の利用性という点から好ましい。水溶性重合体との共有結合を行う前にペプチド合成によるか又は組換え技術によってヒトカルシトニンを形成させることにより生成物の均質な混合物が得られ得る。しかしながら、所望の、適切なアミノ酸残基を全ペプチド合成において組込む前に水溶性重合体に共有結合させることを希望する場合には、均質混合物を形成させる代りに単一分子物質 (single molecular entity) を形成させ得る。しかしながら、勿論、ヒトカルシトニンを、ペプチド合成又は組換え技術によって製造しついでかく形成されたヒトカルシトニンを水溶性重合体に結合させ得る。

【0047】インターロイキン-2はインターロイキン-1の存在下での抗原又はマイトジェンによる活性化によってT-リンパ球によって産生される、可溶性の免疫増強性 (immunoenhancing) グリコプロテイン (糖タンパク質) である。インターロイキン-2はT-細胞の生長と増殖を誘発し、γ-インターフェロン、β-細胞生長因子及びβ-細胞分化因子の放出を可能にし、天然キラー細胞の活性を増大させそして免疫不全症状状態にあるT-細胞の機能を回復させる。ヒトIL-2 (インターロイキン-2) の分離はS. Mita等により "Biochem, Biophys, Res. Commun." 117, 114 (1983) に記載されており、インターロイキン-2の微生物による製造は例えば欧州特許公告第142,268号明細書に記載されている。更に、des-アラニル Ser²⁵ IL-2のごときインターロイキン-2の種々の同族体は例えば米国特許第4,518,584号及び4,530,787号明細書に記載されている。des-アラニル Ser²⁵ IL-2のごときIL-2活性を有するポリペプチドのポリエチレングリコールの結合もPCT特許公告W087/00056号明細書に記載されている。インターロイキン-2活性を有するポリペプチド、例えばIL-2それ自体及びその同族体並びにポリエチレングリコールのごとき水溶性重合体に共有結合されたかかるポリペプチドは癌の治療において潜在的な重要性を有する。

【0048】ヒト生長ホルモン (HGH) は身体の生長を促進し、タンパク質合成を刺激し、炭水化物及び脂質代謝を調節しそしてソマトメジンの血清中の水準を増大させる、種特異性の (species specific) アンボリックプロテインである。HGHのアミノ酸配列及びバクテリア中でのHGHについてのDNAのクローニングと発現はD. V. Goeddel等、"Natural", 281, 544 (1979) 及びベルギー

特許第884,012号明細書及び米国特許第4,342,832号明細書に記載されている。哺乳動物細胞内でのHGHについてのDNAのクローニングと発現はG. N. Pavakis等、“Proc. Natl. Acad. Sci.”, USA, 78, 7398(1981)及びフランス特許第2,534,278号明細書に記載されている。

【0049】HGHは2種のタンパク質を含有していることは理解されるであろう；その一方は22 kDaの分子量を有するものであり、他方は20 kDaの分子量を有するものである(U. J. Lewis等, J. Biol. Chem. 253, 2679~2687 (1978) 及びR. N. P. Singh 及びU. J. Lewis, “Prep. Biochem.”, 11, 559~570(1981)参照)。20 kDa型変種の生長ホルモン(20K-HGH)はヒト下垂体前葉腺、血漿及び尿中の全HGHの5~10%を構成する。アミノ酸配列分析から20K-HGHはアミノ酸配列32~46が欠けているという点においてだけ22K-HGHと異なることが示されている。20K-HGHは生長促進活性と他の活性を有するが、インシュリンと同様の活性は示さないか、少ししか示さない。20K-HGH変種をコードするDNAの分子クローニングは、Masuda等により“Biochemica et Biophysica Acta”, 949, (1988), 125~131に記載されている。

【0050】インターフェロンは広範囲のウイルスの感染に対する非特異的耐性を付与し、細胞の増殖に作用しそして免疫応答を調節する、一系列の種特異性の脊椎動物タンパク質(vertebrate Protein)に与えられた名称である。インターフェロンは文献に広範囲のものが記載されている(例えばC. Weissmann, H. Weber, “Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.”, 33, 251~300(1986) 及びK. C. Zoon, “Interferon” 9, 1~12 (1987) 参照)。インターフェロン系の3つの主要成分は消化された(digested) α , β 及び γ であり、その抗原的及び物理化学的性質、誘導物質(inducer)の種類及びこれを誘導した細胞源に基づいて分類される(“Nature” 286, 110(1980) 参照)。インターフェロンは例えば組換え体DNA製造技術のごとき任意、所望の方法により製造し得る。インターフェロン α の製造はS. Nagata等により“Nature”, 284, 316(1980)及びD. V. Goeddel等により“Nature”, 287, 411 (1980)に記載されているが、インターフェロン α_2 の製造についての特に良好な説明は、M. D. Edge等により“Nucleic Acids Research”, Vol. 11, No. 18, 6419~6435 (1983)に記載されている。インターフェロン β の組換え体製造技術による製造はT. Taniguchi等, “Proc. Natl. Acad. Sci. USA”, 77, 5230 (1980) 及びR. Derynck等, “Nature”, 285, 542 (1980)に記載されている。インターフェロン γ の組換え体製造法による製造はP. W. Gray等により“Nature”, 295, 503 (1982)に記載されており、ヒトインターフェロン γ 遺伝子の構造はP. W. Gray及びD. V. Goeddelにより“Nature”, 298, 859, (1982)に記載されている。インターフェロンは更に、M. D. Edge及びR. Cam

bleにより“Biotechnology and Genetic Engineering Review”, Vol. 2, p215 (1984)に記載されている。少なくともある種のインターフェロンは約pH 8.5では不安定であることを理解すべきである。使用されるインターフェロンはインターフェロン α 又はインターフェロン β であることが有利であり、好ましくは、インターフェロン α 、特に、インターフェロン α_2 である。

【0051】一般的には、本発明で使用されるポリペプチドは組換え体製造技術又はペプチド合成法によって製造し得る。ペプチドの寸法が許容される場合及び2個又はそれ以上の遊離アミノ基(例えばN-末端アミノ基又は1個又はそれ以上のリシン残基)が前記で例示したとき水溶性重合体との共有結合のために存在する場合には、ペプチド合成法は好ましい製造技術である。かかる製造技術は水溶性重合体と共有結合されるリシン残基を分子中の特定の部位に導入することになり、多数の遊離アミノ基を有するペプチドに水溶性重合体を共有結合させることにより得られ得る生成物の不均質な混合物の代りに、単一分子物質を形成させ得ると云う利点を有する。

【0052】使用される製造技術に拘わりなしに、i)水溶性重合体を結合させるために、存在する残基をリシン残基のごとき他の残基により置換することにより、ii)水溶性重合体分子を結合させるための新しいかかる残基を、例えば、N-及び/又はC-端部に付加するか又は、活性が失われるか又は許容し得ない程度まで減少することがないことを条件として分子中に付加することにより及び/又は1個又はそれ以上のかかる残基、例えばリシン残基を置換するか又は除去することによってペプチドを変性して水溶性重合体分子の結合の程度を減少させ、それによって、かかる水溶性重合体の結合によってペプチドの活性が減少するか又は消失する場合に、生成物の不均質性を減少させること及び/又はポリペプチド分子中のある部位における水溶性重合体の結合を排除することが有利であり得る。

【0053】ポリエチレングリコールのごとき水溶性重合体の、形成されたペプチドへの結合又はポリペプチドが形成される前の特定のアミノ酸への結合は、本明細書中に記載されるごとき慣用の方法によって行い得る。

【0054】A.2 水溶性重合体

ポリペプチドに共有結合させる水溶性重合体は例えばデキストラン又はポリ(N-ビニルピロリドン)であり得るが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール単独重合体、ポリオキシエチル化(polyoxyethylated)ポリオール及びポリビニルアルコール(上記単独重合体は一方の端部がアルキル基で置換されているか又は置換されていない)から選ぶことが好ましい。

【0055】ポリペプチドを結合させる特定の重合体としてはポリエチレングリコール(PEG)の単独重合体又はポリオキシエチレン化ポリオールが挙げられるが、但

し、重合体が室温で水溶性であることを条件とする。ポリオキシエチル化ポリオールの場合としては、例えばポリオキシエチル化グリセリン、ポリオキシエチル化ソルビトール又はポリオキシエチル化グルコースが挙げられる。

【0056】ポリオキシエチル化グリセリンのグリセリン主鎖は、天然において、例えば動物又はヒトにおいて産生する、モノー、ジー及びトリグリセリド中の主鎖と同一である。従って、この分岐 (branching) は体内において必ずしも異物 (foreign agent) とは見られないであろう。

【0057】重合体は非置換ポリエチレングリコール (PEG)、モノメチルPEG (mPEG) 又はポリオキシエチル化グリセリン (POG)、特に、モノメチルPEG (mPEG) であることが好ましく、そして、この重合体は、例えば、PEG、mPEG又はPOGカルボン酸の4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホネートエステル又はN-ヒドロキシスクシンイミドエステル、又は、PEG、mPEG又はPOGのp-ニトロフェニルカーボネート又は2,4,5-トリクロルフェニルカーボネートから形成されるアミド結合又はウレタン結合により、好都合にポリペプチドに結合される。所望ならば、ポリペプチドをスペーサーアーム (Spacer arm) としてのアミノ酸又はペプチドを介してmPEGに結合させ得る (L. Sartore等, "Appl. Biochem. Biotechnol.", 27, 45-54 (1991) 参照)。

【0058】重合体の分子量は例えば、使用される特定のペプチドに応じて、約300~100,000であることが好ましく、350~40,000であることがより好ましい。この点に関して、水溶性重合体に関して引用される分子量は数平均分子量であるが、かかる重合体は約1の多分散性 (polydispersity) (後に定義する) を有するので、数平均分子量は重量平均分子量に近似しているであろう。

【0059】PEG単独重合体は置換されていないが、その一方の端部がアルキル基で置換されていてもよい。アルキル基は好ましくは C_{1-4} 、アルキル基であり、最も好ましくはメチル基である。重合体はPEGの非置換単独重合体、PEGのモノメチル置換単独重合体又はポリオキシエチル化グリセリンであることが有利であり、そして、好ましくは1000、より好ましくは1250、特に1500の分子量の下限値及び例えば20,000の分子量の上限値を有することが有利である。所望ならば、分子量の上限値は40,000と云う高さであり得るが、15,000であることが有利であり、好ましくは10,000である。分子量は1000~15,000、例えば2000~10,000、特に2000~5000の範囲であることが好ましい。

【0060】ポリペプチドが自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを有しておりそして水溶性重合体としてPEGの非置換単独重合体又はPEGのモノメチル置換単独重合体を使用した場合には、水溶性重合体の分子量の下限値は750と云う低い値であり得るが、通常、10

00であり、1250であることが有利であり、好ましくは1500、特に、約2000である。

【0061】ポリペプチドはポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール単独重合体 (これらの単独重合体は一方の端部がアルキル基で置換されていないか又は置換されている)、ポリオキシエチル化ポリオール又はポリビニルアルコールに共有結合されるであろう。

【0062】上記したポリペプチドは、例えば、天然分子中に存在するか又は天然分子中に組み込まれた、(1) 遊離アミノ基、(2) タンパク質上の少なくとも1個の炭水化物部分又は(3) 遊離スルフヒドリル (メルカプト) 基を介して水溶性重合体に共有結合され得る。

【0063】かかる技術はM-CSFに関するPCT特許公告WO89/06546号明細書に詳細に記載されている。特に本発明によれば、過剰のポリエチレングリコール (PEG) 又はポリオキシエチル化ポリオール (POP) の活性化エステル又はカーボネートと、前記したときG-CSFポリペプチドとを接触させ、それによって、PEG又はPOPに実質的に最大に共有結合されたG-CSFポリペプチドを形成させることを特徴とする、ポリエチレングリコールに共有結合されたG-CSFポリペプチド又はポリオキシエチル化ポリオールに共有結合されたG-CSFポリペプチドの製造方法が提供される。PEGの活性化カーボネート又はPOPの活性化カーボネートは、少なくとも1個の水酸基を有するPEG又はPOPとクロルギ酸塩とを接触させ、それによって、上記活性化カーボネートを形成させることにより調製することが好ましい。

【0064】PEG又はPOPの活性化エステル又はカーボネートとG-CSFポリペプチドのモル比は200:1~50:1であることが好ましく、より好ましくは150:1~50:1、特に約100:1である。

【0065】使用される方法はVeronese等により "Appl. Biochem. and Biotech.", 11: 141-152 (1985) に開示された方法であって、後に、Cetus CorporationによりIL-2に適用されたかつその米国特許第4,902,502号明細書に記載された方法に類似している。

【0066】水溶性重合体をポリペプチドに結合させることによって結合体 (conjugate) の生物学的性質が所望の水準以下まで低下する場合には、これは、例えば、下記の方法によって克服し得る；すなわち、1) ポリペプチドと水溶性重合体との間で開裂し得る (cleavable) 結合を使用し、その結果、生体内での結合体の放出の後、水溶性重合体をポリペプチドから開裂させて、良好な生物学的活性を有するポリペプチドを得る方法；又は2) 水溶性重合体の結合が、結合体の生物学的活性に有害な影響を与えることのない、ポリペプチド上の部位で生ずるようなポリペプチド分子を形成させる方法 (例えば米国特許第4,904,584号明細書に記載の方法)。しかしながら、所望ならば、ポリペプチドの生物学的活性の減少は、単に、本発明の医薬組成物中に存在させる結合体の

量を増大させることによって排除し得るか又は少なくとも最小限にし得る。

【0067】B. 医薬組成物の構成成分

医薬組成物の構成成分(material of the composition)は、任意の好都合な重合体又はその混合物、例えば、ポリラクチド(前記で定義)又は両親媒性共重合体(例えば欧州特許第92,918号明細書に記載のもの)から誘導された生分解性ヒドロゲル及びポリラクチドとかかるヒドロゲルとの混合物であり得る。ヒドロゲルは特別な有用性を有するが、これは、このヒドロゲルは線状又は分岐鎖ブロック共重合体の成分がポリペプチドに結合している親水性単位(水溶性重合体)に類似する熱力学的性質(thermodynamic identity)を有するように構成し得るという理由に基づくものである。従って例えば、ベギル化ポリペプチドをポリエチレングリコールを含有する両親媒性物質(amphipath)と共に使用することが特に有用である。

【0068】従って、医薬組成物の構成成分は、例えば、欧州特許公告第58,481号明細書に記載されるときポリラクチドであり得る。

【0069】ポリラクチドからの高分子薬剤(macromolecular drug)の放出は、ポリラクチドの構造(すなわち、乳酸/グリコール酸の共重合体中の共単量体の分布及び長さ)、乳酸/グリコール酸の単独重合体及び共重合体の分子量及び該単独重合体又は共重合体の分子量分布又は多分散度に応じて変動する。従って、好ましいポリラクチドはベンゼンに不溶性でありかつ1 w/v%クロロホルム中で25°Cにおいて0.09dl/g以上、但し、4 dl/g以下の固有粘度を有するか、又は、ベンゼンに可溶性でありかつ1 w/v%クロロホルム中で0.09dl/g以上、但し、0.5dl/g以下、好ましくは、0.3dl/g以下の固有粘度を有するものである。他の好ましい種類のポリラクチドは2000以上の数平均分子量を有するかつ2000~10,000の数平均分子量については多分散度が1.2~50であり、5000~30000の数平均分子量については多分散度が1.4~15であるような制御された多分散度を有するものである。好ましい数平均分子量の範囲は2000~20,000である。溶液粘度特性とその測定及び分子量の測定は“Preparative Methods of Polymer Chemistry”, 第2版、第43~52頁、W. R. Serenson及びTod W. Campbell 著、1968年、Interscience publishers発行に記載されている。重合体のこれらの種々の性質によってポリラクチド自体及びこれに基づく医薬組成物の分解のプロフィールが決定される。分解プロフィールには分解しているポリラクチド中の微孔の形成、分解しているポリラクチドの水の吸収及び分解しているポリラクチドの腐蝕又は重量損失が挙げられる。これに関して、重合体自体中への生物学的活性物質の拡散は生物学的活性物質の、放出速度制御重合体(rate controlling polymer)中への溶解性又は該重合体との相溶性及び生物学的活性物質の分子寸法によって

変動する。これらの理由の一方又は両者のために、生物学的活性物質(先に定義)は重合体中に拡散し得ないのであり得る。このような場合には、放出を他のメカニズムによって、例えば重合体マトリックス中の水性相を介することによって生起させなければならない。従って、時間の経過と共に連続的に水を吸収する重合体を製造することが望ましくそしてこの連続的な水の吸収は、最終的には分解して水溶性フラグメント又は浸食生成物(erosion)になる分解中のマトリックス中に水性微孔(aqueous micropore)の生成を伴っている。

【0070】ポリペプチドを水溶性重合体、特に、ポリオキシエチレン重合体に共有結合させて生物学的活性物質を形成させることにより、連続放出型医薬組成物の浸透(パーコレーション)限界(percolation threshold)(先に定義)が有利な影響を受けるものと思われる。浸透限界は無水医薬組成物中の重合体マトリックス中への生物学的活性物質の配合量及び上記重合体マトリックスと生物学的活性物質との相溶性並びに試薬組成物の水和の際の相分離の性質及び程度によって変動する。ポリペプチドの鎖長、水溶性重合体の分子量及び水溶性重合体の配合割合は、いずれも、生物学的活性物質の相溶性に影響を与える要因である。

【0071】所望ならば、本発明の連続放出型医薬組成物は生物学的活性物質の放出が開始する前に、短い誘導期間を有し得る。誘導期間の長さは放出させるべき生物学的活性物質の量及び生物学的活性物質を放出させる期間によって変動し得る。

【0072】本発明の連続放出型医薬組成物はマイクロカプセル形以外の形、例えば、生物学的活性物質が重合体表面まで及び重合体表面を含めて重合体全体に分散している微小球の形あるいは生物学的活性物質が表面まで達している他の微細粒子の形であることが好ましい。

【0073】本発明の連続放出型医薬組成物は、例えば、慣用の臨床的又は獣医学的方法で筋肉内又は皮下注射することによりあるいは外科的に皮下挿入することにより、ペプチドで処理することを希望する動物(例えばヒト)の体内に挿入し得る。

【0074】B.1. 連続放出型医薬組成物の調製方法

本発明の連続放出型医薬組成物は任意の好都合な方法で調製し得る。すなわち、例えば、欧州特許第58,481号明細書に記載される方法に従って、例えば前記したとき医薬組成物の構成成分は水酢酸のごとき有機溶剤中の溶液として提供することができ、この溶液中に生物学的活性物質を分散させることができる。

【0075】B.2. 水性調製法

本発明の連続放出型医薬組成物は、例えば、重合体又は共重合体が少なくとも約3000の重量平均分子量を有しかつそのアンモニウム塩又はアルカリ金属塩の形であること及び分散体の固形分の少なくとも80重量%が200m²の孔寸法を有する細菌濾過器を通過することができること

を特徴とする、1個又はそれ以上のカルボン酸末端基を有する重合体又は共重合体の水性分散体を製造することにより調製し得る。

【0076】かかる水性分散体の製造は、水混和性有機溶剤中の重合体又は共重合体の溶液と、少なくとも化学量論量の、水溶性アンモニウム又はアルカリ金属塩又は水酸化物の溶液とを混合して、本質的に中性pHの混合水性／有機溶剤中の重合体又は共重合体の対応するアンモニウム塩又はアルカリ金属塩の分散体を形成させついで水混和性有機溶剤を蒸発させて、固形分の少なくとも80重量%が200 μ mの孔寸法を有する細菌濾過器を通過することができる、重合体又は共重合体塩の水性分散体を形成させることにより行い得る。

【0077】上記の方法で使用される重合体又は共重合体は、例えば、単体重合体、すなわち、ポリ(D-, L-及びDL-乳酸)、ポリ(D-, L-及びDL-ラクチド)、ポリグリコール酸、ポリグリコライド、ポリ- ϵ -カプロラクトン及びポリ(ヒドロキシ酪酸)；これらの単体重合体が誘導される単体の2種又はそれ以上から誘導された共重合体；上記の単体重合体又は共重合体の1つと、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(エチレングリコール)、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、デキストラン、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン又はこれらの重合体誘導される単体の2種又はそれ以上の共重合体から選ばれた親水性重合体とからなるグラフト又は枝分れ重合体；から選択し得る。

【0078】この水性調製法で使用するのに好ましい重合体又は共重合体は、単体重合体のポリ(D-, L-及びDL-乳酸)及びポリ(D-, L-及びDL-ラクチド)；及び共重合体のポリ(D-, L-又はDL-乳酸-コ-グリコール酸)及びポリ(D-, L-又はDL-ラクチド-コ-グリコライド)である。

【0079】この水性調製法で使用するのに好ましい水混和性溶剤はアセトン、2-ブタノン(メチルエチルケトン)、ジオキサン、ヘキサフルオロイソプロパノール、テトラヒドロフラン、メタノール又はエタノール、特にアセトンである；好ましい水溶性アンモニウム又はアルカリ金属塩又は水酸化物は炭酸水素ナトリウム、カリウム又はアンモニウム、炭酸ナトリウム、カリウム又はアンモニウム又は水酸化ナトリウム、カリウム又はアンモニウムである。

【0080】水性調製法で使用される他の溶剤はジクロルメタンのごとき水と非混和性の溶剤である。かかる溶剤を使用することにより、大きな粒度を有する共重合体の水性分散体を得られる。

【0081】水溶性アンモニウム又はアルカリ金属塩又は水酸化物の溶液は、水溶液であるか又は水と水混和性有機溶剤、例えばメタノール又はエタノールとの混合物

中の溶液であり得る。

【0082】水混和性溶剤の蒸発は減圧下でかつ周囲温度より可能な限り少しだけ高い温度で行うことが好ましい。

【0083】有機溶剤中の重合体又は共重合体の溶液を水性相に添加しそしてこの添加を有機溶剤を蒸発させる前に完了させた場合には、有機溶剤中の重合体又は共重合体の濃度が約1.5w/v%を超えないときは、200 μ mの孔寸法を有するフィルターを通過することのできる粒子が高い収量で得られる。

【0084】この方法においては、重合体又は共重合体の水混和性溶剤中の溶液と水溶性アンモニウム又はアルカリ金属塩又は水酸化物の溶液との混合は、高い剪断力下で攪拌することにより、例えば、25,000 rpm(1分当りの回転数)までの攪拌を行うことのできるイストラル(Ystral)ホモジナイザーを使用して行うことが好ましい。

【0085】ウシ胎児血清(FCS)及びヒト血清アルブミンのごとき可溶化タンパク質(solubilising protein)は医薬組成物中に存在しないことが好ましい。

【0086】本発明の医薬組成物を調製するに当たっては、所与の組成物についての好ましいパラメーターは指針として上記で詳細に述べたことに基づいて実験的に決定し得る。インターロイキン-2(IL-2)、ヒト生長ホルモン(HGH)及びインターフェロン α_2 (IFN α_2)のごときある種のポリペプチドについては、所望の放出プロファイルを得るために変更することが有利な一つのパラメーターは、医薬組成物中のタンパク質含有量であり、これは、IL-2、HGH及びIFN α_2 の場合には、通常、5~20重量%であり、10~18重量%、特に約12.5~16重量%であることが好ましい。

【0087】従来、ポリエチレングリコールのごとき水溶性重合体については、高い生物学的活性を保持することを希望する場合には、所望のポリペプチドの修飾の程度を制限することが必要であることが認められていたことは強張されるべきである。従って、過剰の水溶性重合体と生物学的活性ポリペプチドとを結合させた場合には、生物学的活性が実質的に減少するか又は完全に失われていた。ポリペプチドの修飾の程度を制限することが必要であることにより、ある数、通常、多数の修飾のための潜在的部位の周囲において、所与の数の水溶性重合体分子の不均質な分布が増大する。かかる高度の不均質性は溶解度及び半減期のごときパラメーターに対しては僅かしか影響を及ぼさないが、異性体の不均質な集団(population)は、医薬組成物からの放出の均一性(consistency)と完全性を低下させるため、連続放出型医薬組成物からの制御されたかつ完全な放出を行わせることに対しては不利である。驚くべきことに、本出願人の欧州特許出願第91303868.3に記載されるG-CSF誘導體、特に、[Arg¹,ser^{17,27,60,65}] G-CSF(これはプレシークエン

スメチオンを有しているか又は有していないが、かかる配列を有することが好都合である）は、前記したとき水溶性重合体、特に、モノメチルポリエチレングリコール(mPEG)のごときポリエチレングリコール(PEG)による徹底的修飾を行うことができ、しかも、自然産生G-CSFの生物学的性質の少なくとも1つを保持していることが認められた。すなわち、例えば、ベギル化G-CSFについて行った試験結果から、自然産生G-CSFのG-CSF活性が生体内で約2の倍率(factor)の範囲で保持されていることが認められた。実際に、ベギル化[Arg¹¹,ser^{17,27,60,65}] G-CSFを用いて生体内試験を行って得られた投与量応答曲線(dose response curve)は、自然産生G-CSFの活性の約2倍の活性を示す。かかる徹底的修飾を行った場合、異性体の不均質集団が実質的に減少し、これによって、医薬組成物において該組成物からの放出の均一性と完全性が増大する。

【0088】本発明の医薬組成物中で使用するのに最も好ましい生物学的活性物質はベギル化[Arg¹¹,ser^{17,27,60,65}]トG-CSFである；このG-CSFにおいてはG-CSF部分にプレシーケンスヌチオンが存在しているかあるいは存在していないが、この配列が存在していることが好都合でありそして各ポリエチレングリコール(PEG)部分は2000~5000Daの分子量を有しており、G-CSF部分とPEG部分の比率は1:3~1:4、特に約1:3.9である。

【0089】C. 用語の説明

本明細書中で使用されている用語について以下に説明する。“水性生物学型環境”(“aqueous physiological-type environment”)という用語は、温血動物の身体部分、特に筋組織又は皮下組織又は循環系を意味するが、実験室の研究においては、場合により生理学的pHに緩衝された35~40℃の温度の水性液体がかかる環境に似ている。

【0090】本明細書においては、“連続放出”(“continuous release”)と云う用語は、本質的に一段階的(monophasic)である放出形式を意味するが、この形式は生物学的活性物質の蓄積的放出量を時間の関数としてプロットした場合、変曲点(point of inflection)を有し得るが、“プラトー”(“plateau”)段階は確実に有していない。

【0091】本明細書において使用される“一段階的”(“monophasic”)という用語は、ある時間的間隔に亘っての連続的な放出であって、その間に、生物学的活性物質の蓄積的放出量を時間の関数としてプロットした場合、変曲点は存在し得るがプラトー段階は確実に存在しないものを意味する。

【0092】“ポリラクチド”という用語は、乳酸単独の重合体、乳酸とグリコール酸の共重合体、上記重合体の混合物、上記共重合体の混合物及び上記重合体と共重合体との混合物を包含させるために一般的な意味で使用

されている；乳酸はラセミ型であるか又は光学活性型である。

【0093】“酸安定性”(“acid-stable”)という用語は、生物学的活性物質が意図する用途での使用中に医薬組成物内で遭遇する条件下で安定であることを意味することを理解すべきである。医薬組成物内のpHは変化するが、通常、pH8より高くないが、pH2より低くないであろう。このpH値は両極端を表わしており、所与の医薬組成物内のpHは2.5又は3より低いものでは決してあり得ない。関連する温度は、通常、哺乳動物の体温であり、通常、約40℃までであろう。意図される使用期間は例えば1週間~6ヶ月である。

【0094】“多分散性”(“polydispersity”)という用語は M_w/M_n (ここで M_w は重量平均分子量であり、 M_n は数平均分子量である)と定義される。数平均分子量の絶対測定は末端基定量法又は蒸気浸透圧法によって行い得る。数平均及び重量平均分子量及び多分散性の測定はポリスチレン標準についてのサイズ排除クロマトグラフィーによっても行い得る。

【0095】“パーコレーション(浸透)限界”(“percolation threshold”)という用語は、水性薬剤(生物学的活性物質)相が外部環境及び本発明の連続放出型医薬組成物内の水性薬剤(生物学的活性物質)の他のドメイン(領域)(domain)との連続性(continuity)を達成したときに得られる状態を意味する。

【0096】本明細書中で使用されている“自然産生(又は天然に産生する)G-CSF”(“naturally occurring G-CSF”)と云う用語は、天然に存在することが知られているG-CSFを意味しそしてSEQ ID No 32に記載されているアミノ酸配列を有する2種のポリペプチドを包含する。これらの2種のポリペプチドは、トリペプチドインサート(tripeptide insert) Val-Ser-Gluが一方のポリペプチドにおいては35と36の位置の間に存在するが、他方のポリペプチドにおいては存在しないことにおいて相違するに過ぎない。本明細書中で使用される位置番号系(numberingsystem)はVal-Ser-Gluインサートを含有していない、天然に産生するポリペプチドに基づくものであり、従って、本明細書中で使用される“自然

(“native”)という用語はVal-Ser-Gluインサートを含有していないこのポリペプチドを意味する。前記したとき修飾は、前記したとき天然に産生する形のG-CSF及びその同族体の全てに適用可能であること及び修飾のために選択された、天然に産生するG-CSFの形に応じて、ポリペプチドの位置番号の修正(revision)が必然的に必要であることは理解されるであろう。

【0097】ポリペプチドに適用される“自然産生G-CSFの生物学的活性の少なくとも1つを有する”と云う用語は、ポリペプチドがPCT特許公告W087/01132号明細書に記載されるとき生物学的定量法の少なくとも1つにおいて活性を示すことを意味する。

【0098】“溶液安定度” (“solution stability”) と云う用語は、pH、温度及びイオン濃度からなる生物学的条件下で、ある物質がその溶液から沈澱する傾向の減少の程度を意味する。従って、溶液安定度は溶解度とは異なるものである。

緩衝液成分

	最終濃度 (mmol/l)				
	A	B	L	M	H
トリス-アセテート	33	—	—	—	—
トリス-HCl	—	10	10	10	50
Mg-アセテート	10	—	—	—	—
MgCl ₂	—	5	10	10	10
K-アセテート	66	—	—	—	—
NaCl	—	100	—	50	100
ジチオエリスリトール (DTE)	—	—	1	1	1
ジチオトレイトール (DTT)	0.5	—	—	—	—
2-メルカプトエタノール	—	1	—	—	—
37°CでのpH	7.9	8.0	7.5	7.5	7.5

上記緩衝液はBoehringer Manheim社から入手される。

【0100】特定部位の突然変異誘発法において—参考例4

- 緩衝液1 100mM トリス HCl pH 8.0
100mM NaCl
20mM MgCl₂
- 緩衝液2 10mM トリス HCl pH 8.0
20mM NaCl
1mM EDTA
- 緩衝液3 12mM トリス HCl pH 7.7
30mM NaCl
10mM MgCl₂
8mM 2-メルカプトエタノール
- 緩衝液4 60mM トリス HCl pH 8.0
90mM NaCl
6mM MgCl₂
10mM DTT

【0101】ヌクレオチド混合物1：各々250 μM のdATP, dGTP, dCTP=S(dCTP のホスホロチオエート誘導体)、dTTP及び1 mMのATP

ヌクレオチド混合物2：各々250 μM のdATP, dGTP, dCTP, dTTP及び350 μM のATP。

【0102】ジェネクリーン (Geneclean) (商標)

このキット (kit) は1) 6M沃化ナトリウム、2) 塩化ナトリウム/エタノール/水洗浄液を調製するための、塩化ナトリウム、トリス及びEDTAの濃厚溶液；3) ガラスミルク (Glassmilk) (商標) —シリカマトリックスの水中の懸濁液1.25mlを含有する1.5 mlビン—；を含有している。これは、“Proceedings of the National Academy of Science USA” (1979), Vol. 76, p615に記載されたVo gelstein及びGillespie の方法に基づくDNA 精製技術である。

*【0099】下記の物質が以下の実施例及び参考例で言及されており、その構成はつぎの通りである：

制限酵素に対する緩衝液

安定性：-20°Cで安定

* 緩衝液組成

最終濃度 (mmol/l)

[1:10稀釈設定緩衝液 (set buffer)]

	A	B	L	M	H
トリス-アセテート	33	—	—	—	—
トリス-HCl	—	10	10	10	50
Mg-アセテート	10	—	—	—	—
MgCl ₂	—	5	10	10	10
K-アセテート	66	—	—	—	—
NaCl	—	100	—	50	100
ジチオエリスリトール (DTE)	—	—	1	1	1
ジチオトレイトール (DTT)	0.5	—	—	—	—
2-メルカプトエタノール	—	1	—	—	—
37°CでのpH	7.9	8.0	7.5	7.5	7.5

【0103】別法として、“Molecular Cloning - a Laboratory Manual”、第2版、Sambrook, Fritsch 及び Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory; 1989) に記載される任意の方法を使用し得る。

ファルマシア (Pharmacia) No 27-9250のランダムラベルキットプロダクト (Landom Labe Kit Product)

この方法は“Molecular Cloning - a Laboratory Manual”、第2版、Sambrook, Fritsch 及びManiatis, p.p. 10.13-10.17 (ColdSpring HarborLaboratory, 1989) に記載されている。

シクイナーゼ (Sequenase) (商標)

30 化学的に修飾されたT7 DNAポリメラーゼ。“Proceedings of the National Academy of Science USA” (1987), Vol. 84, pp. 4767-4771に記載されるTabor 及びRichardsonの方法に基づく。

【0104】ウルトロゲルACA ゲル (Ultroge1 ACA gel S)

ポリアクリルアミドとアガロースの混合マトリックス：これは2種の成分の相乗的係合 (synergistic association) によりポリアクリルアミドの高い再溶解アガロースの剛性を提供する。ウルトロゲルACA は5%のポリアクリルアミドと4%のアガロースを含有する。

M9 最小培地

塩化アンモニウム	1 g
オルソリン酸水素二ナトリウム	6 g
オルソリン酸水素カリウム	3 g
塩化ナトリウム	0.5 g
蒸留水	1 l

補充剤/75ml

300 μl	50% グルコース
75 μl	1M MgSO ₄
50 75 μl	0.1M CaCl ₂

75 μ l 4mg/mlチアミン75 μ l 20%カゼインアミノ酸

【0105】微量元素溶液 (TES)

	*	
AlCl ₃ 6H ₂ O	0.1mg l ⁻¹	100 μ g l ⁻¹
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.04mg l ⁻¹	40 μ g l ⁻¹
KCr(SO ₄) ₂ 12 H ₂ O	0.01mg l ⁻¹	10 μ g l ⁻¹
CuCl ₂ 2H ₂ O	0.01mg l ⁻¹	10 μ g l ⁻¹
H ₃ BO ₃	0.005mg l ⁻¹	5 μ g l ⁻¹
KI	0.1mg l ⁻¹	100 μ g l ⁻¹
MnSO ₄ H ₂ O	0.1mg l ⁻¹	100 μ g l ⁻¹
NiSO ₄ 6H ₂ O	0.0045mg l ⁻¹	4.5 μ g l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.02mg l ⁻¹	20 μ g l ⁻¹
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.02mg l ⁻¹	20 μ g l ⁻¹

【0106】T4DNA リガーゼ

“Molecular Cloning-a Laboratory Manual” 第2版、
Sambrook, Fritsch 及びManiatis, 5.60~5.64 (Cold S
pring Harbor Laboratory 1989) 及びWeiss B.他J. Bio
l. Chem. Vol 243, p 4543 (1968) に記載

【0107】OXOID 磷酸緩衝液

本明細書中で使用されているOXOID 磷酸緩衝液はDulbec
co “A” tablets によって提供されるものであり、下記
の組成を有する:

塩化ナトリウム	8.0 g/l
塩化カリウム	0.2 "
リン酸二水素ナトリウム	1.15 "
リン酸二水素カリウム	0.2 "

pH=7.3

10錠を1 lの蒸留水に溶解しついで10分間115 °Cでオー
トクレーブ処理して、不溶性物質を含有していない溶液
を得る。上記の溶液はカルシウムとマグネシウムが省略
されていること以外、Dulbecco及びVoigt (1954), J. E
xp. Med. 99(2), 167-182 の原組成物に相当する。本明
細書中で言及されている全てのヌクレオチド配列は5'-
3'センス(sense) 内で特定されている。本発明の誘導体
はhu G-CSFとも称されるヒトG-CSFに基づくものであ
る。実施例で調製された誘導体は、全て、大腸菌を使用
して調製されているので、プレシーケンヌヌチオニン
が、通常、存在するであろう。“N-ラウロイルサルコシ
ン” という用語は塩の形でこの物質の使用を意味す
る。すなわち、実施例及び参考例においてはN-ラウロイ
ルサルコシンはナトリウム塩の形で使用されている。

【0108】モノメチルポリエチレングリコール5000は
本明細書中ではメチルポリエチレングリコール5000とも
称されており、また、研究化学のあるカタログにおいて
はメトキシポリエチレングリコール5000とも称されてい
る。以下に本発明の実施例を示す。

【0109】実施例1

PEG 5000-[Met¹, Ser^{17,27}] hu G-CSFを含有する連続
放出型製薬組成物

氷酢酸法

* TES は下記の組成を有しかつ0.5ml/l の濃度で増殖培地
に添加される:

	*	
AlCl ₃ 6H ₂ O	0.1mg l ⁻¹	100 μ g l ⁻¹
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.04mg l ⁻¹	40 μ g l ⁻¹
KCr(SO ₄) ₂ 12 H ₂ O	0.01mg l ⁻¹	10 μ g l ⁻¹
CuCl ₂ 2H ₂ O	0.01mg l ⁻¹	10 μ g l ⁻¹
H ₃ BO ₃	0.005mg l ⁻¹	5 μ g l ⁻¹
KI	0.1mg l ⁻¹	100 μ g l ⁻¹
MnSO ₄ H ₂ O	0.1mg l ⁻¹	100 μ g l ⁻¹
NiSO ₄ 6H ₂ O	0.0045mg l ⁻¹	4.5 μ g l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.02mg l ⁻¹	20 μ g l ⁻¹
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.02mg l ⁻¹	20 μ g l ⁻¹

組成物A (蛋白質20%装填率)

27.7mgのポリラクチド (50重量%のd, l-ラクチド/50重
量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7673, 多分
散度2.59) を1.0 mlの氷酢酸に溶解させた。参考例3で
調製したPEG 5000-[Met¹, Ser^{17,27}] hu G-CSFの水溶
液 (9mg/ml) 1 mlを凍結乾燥させ次いで別量1 ml分の氷
酢酸に溶解させた。これら2種類の溶液を混合し、別量
2 × 0.5ml 分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。
得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールの浴中で
直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。85°Cに加熱した定
盤を有する油圧プレスを用いて、凍結乾燥した粉末を完
全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ1mmのスラ
ブ板を得た。このスラブ板を切断して大体10mgの重量を
有するデポ (depots) とした。次いで2 mlのオキシド
 (OXOID) 磷酸緩衝液と0.02%のナトリウムアジドとを
含有するプラスチックの小ビンにデポを入れ、37°Cで貯蔵
した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新鮮な緩衝液を
補充した。PEG 5000-[Met¹, Ser^{17,27}] hu G-CSFの放
出は媒体のhplc分析によって測定し、蛋白質の累積放出
を算出した (図15参照)。

【0110】実施例2

PEG 5000-[Met¹, Ser^{17,27}] hu G-CSFを含有する連続
放出型製薬組成物

氷酢酸法

組成物B (15.36 %の蛋白質装填率)

155.43mgのポリラクチド (50重量%のd, l-ラクチド/50
重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7791.2,
多分散度2.65) を2.0ml の氷酢酸に溶解させた。参考例
3で調製したPEG 5000-[Met¹, Ser^{17,27}] hu G-CSFの
水溶液 (10.56mg/ml) 3.79 mlを凍結乾燥させ (凍結乾燥
後の重量は104.94mgである) 次いで別量2.0 ml分の氷酢
酸に溶解させた。これら2種類の溶液を混合し、別量4
× 0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得
られた溶液をジクロロメタン/ドリコールの浴中で直
ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。70°Cに加熱した定盤
を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合
し、次いでこの温度で成形して厚さ1mmのスラブ板とし

た。このスラブ板を切断して大体70mgの重量を有するデボとした。次いで2mlのオキシドリン緩衝液と0.02%のナトリウムアジドとを含有するプラスチックの小ビンにデボを入れ、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新鮮な緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Ser^{17,27}]hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(図15参照)。

【0111】比較例1

[Met¹,Ser^{17,27}]hu G-CSFを単独で含有する連続放出型製薬組成物

氷酢酸法

組成物C(20%の蛋白質装填率)

160.73mgのポリラクチド(50重量%のd,l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7673、多分散度2.59)を2.0mlの水酢酸に溶解させた。[Met¹,Ser^{17,27}]hu G-CSFの水溶液(10.0mg/ml)の4.088mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0ml分の水酢酸に溶解させた。これら2種類の溶液を混合し、別量2×0.5ml分の水酢酸を用いてガラス容器をゆすいた。ジクロロメタン/ドリコールドの浴中で該溶液を直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。95°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し次いでこの温度で成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して大体74mgの重量を有するデボとした。2mlのオキシドリン緩衝液と0.02%のナトリウムアジドとを含有するプラスチックの小ビンにデボを入れ、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。[Met¹,Ser^{17,27}]hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(図16参照)。

【0112】比較例2

[Met¹,Ser^{17,27}]hu G-CSFとメチルPEG 5000とを含有する連続放出型製薬組成物

氷酢酸法

組成物D(20%の蛋白質装填率)

120.66mgのポリラクチド(50重量%のd,l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7673、多分散度2.59)を2.0mlの水酢酸に溶解させた。[Met¹,Ser^{17,27}]hu G-CSFの水溶液(10.0mg/ml)の3.935mlを凍結乾燥させ次いで氷酢酸に入れた40.82mgのメチルPEG 5000を含有する溶液2.0mlに溶解した。これら2種類の溶液を混合し、別量2×0.5mlの水酢酸を用いてガラス容器をゆすいた。

【0113】得られた溶液を、ジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。95°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して大体74mgの重量を有するデボとした。2mlのオキシドリン緩衝液と0.02%のナトリウムアジドとを含有するプラスチック

製の小ビンにデボを入れ、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。[Met¹,Ser^{17,27}]hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(図16参照)。

【0114】実施例3

PEG 5000-[Met¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰]hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

氷酢酸法

組成物E(20%の蛋白質装填率)

- 10 120.34mgのポリラクチド(50重量%のd,l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7673、多分散度2.59)を2.0mlの水酢酸に溶解させた。参考例8で調製したPEG 5000-[Met¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰]hu G-CSFの水溶液(10.7mg/ml)3.738mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0ml分の水酢酸に溶解した。これら2種類の溶液を混合し、別量2×0.5ml分の水酢酸を用いてガラス容器をゆすいた。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。85°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約70mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、2mlのオキシドリン緩衝液と0.02%のナトリウムアジドとを含有するプラスチック製の小ビンに入れ、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰]hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(図19参照)。

30 【0115】実施例4

PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

氷酢酸法

組成物F(20%の蛋白質装填率ポリペプチド)

- 40 120.40mgのポリラクチド(50重量%のd,l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7673、多分散度2.59)を2.0mlの水酢酸に溶解させた。参考例7で調製したPEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF(11.5mg/ml)の水溶液3.478mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0ml分の水酢酸に溶解した。これら2種類の溶液を混合し、別量2×0.5ml分の水酢酸を用いてガラス容器をゆすいた。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。85°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約72mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、2mlのオキシドリン緩衝液と0.02%のナトリウムアジドとを含有するプラスチック製の小ビンに入れ、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな

緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹,Arg¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplcにより測定し、蛋白質の累積放出を算出した(図20参照)。

【0116】実施例5

PEG 5000-[Met⁻¹] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

120.11mgのポリラクチド(50重量%のD,L-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9429、多分散度2.02)を20mlの無水物無含有氷酢酸に溶解させた。PEG 5000-[Met⁻¹] hu G-CSF(10.7mg/ml)の水溶液3.738mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0mlの氷酢酸に溶解した。これら2種類の溶液を混合し、別量4×0.5ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。65℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約70mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に入れた0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0mlを含むプラスチック製の小ビンに入れ、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹] G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0117】B. 水性法

4.0gのポリラクチド(50重量%のD,L-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9429、多分散度2.02)を16.0mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウム水溶液(20mg/ml)の4mlを滴加した。別量40mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られた分散物をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。続いてこの重合体のナトリウム塩を使用前に室温で真空下に貯蔵した。

【0118】得られた重合体のナトリウム塩120.87mgを2.0mlの蒸留水に分散させた。PEG5000-[Met⁻¹] hu G-CSF(10.7mg/l)の水溶液3.738 mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。65℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し次いで成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約80mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に入れた0.02重量/容量%のナトリウムアジド溶液の2.0 mlを含有するプラスチック製の小

ビンに入れ、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0119】実施例6

PEG 5000-[Met⁻¹,Ser¹⁷] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

119.75mgのポリラクチド(50重量%のD,L-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9429、多分散度2.02)を20mlの無水物無含有氷酢酸に溶解させた。参考例13で調製したPEG 5000-[Met⁻¹,Ser¹⁷] hu G-CSF(8.08mg/ml)の水溶液4.95mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0 ml分の氷酢酸に溶解した。これら2種類の溶液を混合し、別量4×0.5ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。65℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し次いで成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約70mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液の0.02重量/容量%ナトリウムアジド溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに入れ、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹,Ser¹⁷] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0120】B. 水性法

4.0gのポリラクチド(50重量%のD,L-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9429、多分散度2.02)を16.0mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)の4mlを滴加した。別量40mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。該分散物をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。続いてこの重合体のナトリウム塩を使用前に室温で真空下に貯蔵した。

【0121】120.80mgの該重合体のナトリウム塩を2.0mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met⁻¹,Ser¹⁷] hu G-CSF(8.08mg/l)の水溶液4.95mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。65℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し次いで成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約80mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボをオキシ

イド磷酸緩衝液に入れた0.02重量/容量%のナトリウムアジド溶液2.0mlを含有するプラスチック製の小ビンに入れ、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG5000-[Met¹,Ser¹⁷] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0122】実施例7

PEG 5000-[Met¹,Arg^{11.16},Ser^{17.27.60.65}] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

120.72mgのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9429、多分散度2.02)を2.0mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。参考例19で調製したPEG 5000-[Met¹,Arg^{11.16},Ser^{17.27.60.65}] hu G-CSF(11.53mg/ml)の水溶液3.47mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0mlの氷酢酸に溶解した。これら2種類の溶液を混合し、別量4×0.5ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。65°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約65mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシド磷酸緩衝液に入れた0.02重量/容量%のナトリウムアジド溶液2.0mlを含有するプラスチック製の小ビンに入れ、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Arg^{11.16},Ser^{17.27.60.65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0123】B. 水性法

4.0gのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9429、多分散度2.02)を16.0mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウム水溶液(20mg/ml)の4mlを滴加した。別量40mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られた分散物をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。続いてこの重合体のナトリウム塩を使用前に室温で真空中に貯蔵した。

【0124】119.71mgの重合体のナトリウム塩を2.0mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met¹,Arg^{11.16},Ser^{17.27.60.65}] hu G-CSF(11.53mg/ml)の水溶液3.47mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記懸濁物に添加した。別量4×0.5ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。凍結乾燥した粉末を、65

°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて完全に混合し、次いで成形して厚さ1mmのスラブ板とした。このスラブ板を切断して約70mgの重量を有するデボとした。これらのデボを次いで、オキシド磷酸緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0mlを含有するプラスチック製の小ビンに入れ、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Arg^{11.16},Ser^{17.27.60.65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0125】実施例8

PEG 5000-[Met¹,Arg^{11.23},Ser^{17.27.60.65}] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

120.11mgのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9429、多分散度2.02)を2.0mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。参考例14で調製したPEG 5000-[Met¹,Arg^{11.23},Ser^{17.27.60.65}] hu G-CSFの水溶液(10.93mg/ml)の3.66mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0mlの氷酢酸に溶解した。これら2種類の溶液を混合し、別量4×0.5ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。65°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1mmのスラブ板とした。このスラブ板を切断して約80mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシド磷酸緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Arg^{11.23},Ser^{17.27.60.65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0126】B. 水性法

4.0gのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9429、多分散度2.02)を16mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)4mlを滴加した。別量40mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られた分散物をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて使用前に室温で真空中に貯蔵した。

【0127】120.71mgの重合体のナトリウム塩を2.0mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met¹,Arg^{11.23},Ser^{17.27.60.65}] hu G-CSFの水溶液(10.93mg/ml)の3.66

1を凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。65℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板とした。このスラブ板を切断して約70mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキソイド燐酸緩衝液に溶かした0.02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Arg^{11,13},Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表1参照）。

【0128】実施例9

PEG 5000-[Met¹,Arg^{11,14},Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

120.65mgのポリラクチド（50重量％のd, l-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75）を2.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解した。参考例20で調製したPEG 5000-[Met¹,Arg^{11,14},Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの水溶液(10.5mg/ml)の3.810 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの氷酢酸に溶解した。これら2種類の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板とした。このスラブ板を切断して約70mgの重量のデボとした。次いでこれらのデボを、オキソイド燐酸緩衝液に溶かした0.02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG5000-[Met¹,Arg^{11,14},Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表1参照）。

【0129】B. 水性法

5.0gのポリラクチド（50重量％のd, l-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75）を20mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した（イストラル1500ホモジナイザー）。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)の5 mlを滴加した。別量50mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。ジクロロメタンを回転蒸発器の使用により除去した。分散物をジクロロメタン／ドリコールの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。得られた重合

体のナトリウム塩を使用前に室温で真空中に貯蔵した。

【0130】120.15mgの重合体のナトリウム塩を2.0 mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met¹,Arg^{11,14},Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(10.5mg/ml)の水溶液3.810 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記の懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板とした。このスラブ板を切断して約75mgの重量を有するデボとした。これらのデボを次いで、オキソイド燐酸緩衝液に溶かした0.02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を除去し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Arg^{11,14},Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表1参照）。

【0131】実施例10

PEG 5000-[Met¹,Arg^{11,10},Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

120.74mgのポリラクチド（50重量％のd, l-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75）を2.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。参考例21で調製したPEG 5000-[Met¹,Arg^{11,10},Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(10.6mg/ml)の水溶液3.77mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの氷酢酸に溶解した。これら2種類の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合させ、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約85mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキソイド燐酸緩衝液に溶かした0.02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を除去し新たな緩衝液を補充した。PEG5000-[Met¹,Arg^{11,10},Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表1参照）。

【0132】B. 水性法

5.0gのポリラクチド（50重量％のd, l-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75）を20mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した（イストラル1500ホモジナイザー）。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)の5 mlを滴

加した。別量50mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られた分散物をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。続いてこの重合体のナトリウム塩を使用前に室温で真空中に貯蔵した。

【0133】120.20mgの該重合体のナトリウム塩を2.0 mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met¹, Arg^{1,10}, Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(10.6mg/ml)の水溶液3.77mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約72mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量／容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチックの小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹, Arg^{1,10}, Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0134】実施例11

PEG 5000-[Met¹, Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

119.79mgのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド／50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を2.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。参考例22で調製したPEG 5000-[Met¹, Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(12.6mg/ml)の水溶液3.175 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの氷酢酸に溶解した。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約80mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量／容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹, Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の

表1参照)。

【0135】B. 水性法

5.0gのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド／50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を20mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下で配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)を5 ml滴加した。別量50mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる分散物をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて使用前に室温で真空中に貯蔵した。

【0136】119.67mgの該重合体のナトリウム塩を2.0 mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met¹, Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(12.6mg/ml)の水溶液3.175 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し次いで成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約90mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量／容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹, Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0137】実施例12

PEG 5000-[Met¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Arg³⁰] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

120.25mgのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド／50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を2.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。参考例15で調製したPEG 5000-[Met¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Arg³⁰] hu G-CSF(13.8mg/ml)の水溶液2.899 mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0 mlの氷酢酸に溶解した。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合させ次いで成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約100 mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.

02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹,Glu¹³,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Arg³⁰] hu G-CSFの放出は媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表1参照）。

【0138】B. 水性法

5.0gのポリラクチド（50重量％のd, 1-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691,多分散度1.75）を20mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した（イストラル1500ホモジナイザー）。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液（20mg/ml）5 mlを滴加した。別量50mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られた分散物をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて使用前に室温で真空下に貯蔵した。

【0139】120.37mgの該重合体のナトリウム塩を2.0 mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met⁻¹,Glu¹³,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Arg³⁰] hu G-CSF（13.8mg/ml）の水溶液2.899 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約100 mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹,Glu¹³,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Arg³⁰] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表1参照）。

【0140】実施例13

PEG 5000-[Met⁻¹,Ser^{17,27,115,116},Glu¹¹¹] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

120.80mgのポリラクチド（50重量％のd, 1-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691,多分散度1.75）を2.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。参考例16で調製したPEG 5000-[Met⁻¹,Ser^{17,27,115,116},Glu¹¹¹] hu G-CSF（12.0mg/ml）の水溶液3.333 mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0 mlの氷酢酸に溶解させた。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られ

た溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約95mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹,Ser^{17,27,115,116},Glu¹¹¹] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表1参照）。

【0141】B. 水性法

5.0gのポリラクチド（50重量％のd, 1-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691,多分散度1.75）を20mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した（イストラル1500ホモジナイザー）。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液（20mg/ml）の5.0 mlを滴加した。別量50mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる分散物をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて使用前に室温で真空下に貯蔵した。

【0142】119.83mgの該重合体のナトリウム塩を2.0 mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met⁻¹,Ser^{17,27,115,116},Glu¹¹¹] hu G-CSF（12.0mg/ml）の水溶液3.333 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約95mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹,Ser^{17,27,115,116},Glu¹¹¹] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplcにより測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表1参照）。

【0143】実施例14

PEG 5000-[Met⁻¹,Arg^{1,165},Ser^{17,27},Lys³⁸] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

119.28mgのポリラクチド（50重量％のd, 1-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691,多分散度1.75）を2.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解

させた。PEG 5000-[Met⁻¹, Arg^{1.165}, Ser^{17.27}, Lys³⁸] hu G-CSF(17.905mg/ml)の水溶液2.224 mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0 mlの水酢酸に溶解した。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の水酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約100 mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹, Arg^{1.165}, Ser^{17.27}, Lys³⁸] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0144】B. 水性法

5.0gのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を20mlのジクロロメタンに溶解させ高剪断下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)の5.0 mlを滴加した。別量50mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られた分散物をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて使用前に室温で真空中に貯蔵した。

【0145】119.82mgの該重合体のナトリウム塩を2.0 mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met⁻¹, Arg^{1.165}, Ser^{17.27}, Lys³⁸] hu G-CSF(17.985mg/ml)の水溶液2.224mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記懸濁物に添加し混合した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約90mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹, Arg^{1.165}, Ser^{17.27}, Lys³⁸] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0146】実施例15

PEG 5000-[Met⁻¹, Ser^{17.27}, Lys^{49.58}, Ala^{44.51.53}]

hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 水酢酸法

119.83mgのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を2.0 mlの無水酢酸無含有水酢酸に溶解させた。参考例18で調製したPEG 5000-[Met⁻¹, Ser^{17.27}, Lys^{49.58}, Ala^{44.51.53}] hu G-CSF(17.262mg/ml)の水溶液2.317 mlを凍結乾燥させ、次いで別量2.0 mlの水酢酸に溶解した。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の水酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約100 mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で、水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹, Ser^{17.27}, Lys^{49.58}, Ala^{44.51.53}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0147】B. 水性法

5.0gのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を20mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)の5.0 mlを滴加した。別量50mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる分散物をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて使用前に室温で真空中に貯蔵した。

【0148】120.82mgの該重合体のナトリウム塩を2.0 mlの蒸留水に分散させた。PEG 5000-[Met⁻¹, Ser^{17.27}, Lys^{49.58}, Ala^{44.51.53}] hu G-CSF(17.262mg/ml)の水溶液2.317 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約100 mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を

取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met^{17,27},Ser^{17,27},Lys^{19,38},Ala^{44,51,55}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0149】実施例16

PEG 750-[Met¹⁷,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

氷酢酸法

150.11mgのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を2.0 mlの無氷酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。参考例24で調製したPEG 750-[Met¹⁷,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(8.55mg/ml)の水溶液4.678 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの氷酢酸に溶解した。これら2種の溶液を混合し別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約75mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキソイドリン酸緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 750-[Met¹⁷,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0150】実施例17

PEG 2000-[Met¹⁷,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法

140.32mgのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を2.0 mlの無氷酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。参考例23で調製したPEG 2000-[Met¹⁷,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(8.52mg/ml)の水溶液4.695 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの氷酢酸に溶解した。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧ブ

*レスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約70mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキソイドリン酸緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 2000-[Met¹⁷,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0151】B. 水性法

5.0gのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を20mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)の5.0 mlを滴加した。別量50mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる分散物をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて使用前に室温で真空下に貯蔵した。

【0152】140.85mgの該重合体のナトリウム塩を2.0 mlの蒸留水に分散させた。PEG 2000-[Met¹⁷,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(8.25mg/ml)の水溶液4.695 mlを凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。得られた溶液を前記懸濁物に添加し、混合した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに冷凍させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し次いで成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約70mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキソイドリン酸緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒質を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 2000-[Met¹⁷,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した(以下の表1参照)。

【0153】

表 1 A

ラクチド-グリコリド: G 1:1 組成物からG-CSF 同族体の放出					
実施例 No	方法	蛋白質の装填率 (重量%)	重合体装填率 (重量%)	重合体 No.	プレス温度 (℃)
5A	GAA	16.26	48.81	310	65
5B	Aq	16.16	48.83	310	65
6A	GAA	16.89	50.56	310	65

47					48
6B	Aq	16.84	50.87	310	65
7A	GAA	17.49	52.79	310	65
7B	Aq	17.65	52.82	310	65
8A	GAA	16.94	50.88	310	65
8B	Aq	16.88	50.95	310	65
9A	GAA	16.54	49.87	312	90
9B	Aq	16.60	49.87	312	90
10A	GAA	16.49	49.77	312	95
10B	Aq	15.73	47.27	312	95
11A	GAA	15.23	45.60	312	95
11B	Aq	14.87	44.48	312	95
12A	GAA	16.08	48.35	312	90
12B	Aq	16.12	48.52	312	95
13A	GAA	16.51	49.85	312	90
13B	Aq	16.38	49.06	312	95
14A	GAA	16.19	48.27	312	90
14B	Aq	15.92	47.68	312	95
15A	GAA	15.63	46.81	312	90
15B	Aq	15.06	45.48	312	95
16	GAA	19.17	71.95	312	90
17A	GAA	17.30	60.93	312	90
17B	Aq	17.56	62.82	312	90

前記の用語“GAA”及び“Aq”はそれぞれ処方する際の
氷酢酸法及び水性法を記載する

＊

表 1 B

前記組成物からの蛋白質の放出率

実施例 以下の日数での蛋白質放出率(%)

No	1	4	6	11	16	18
5A	27.1	36.5	37.1	37.5	37.5	37.5
5B	33.3	37.5	38.6	39.1	40.1	40.1
6A	77.0	96.4	102.7	106.7	111.3	112.9
6B	56.8	86.6	98.3	103.9	109.4	
7A	42.5	55.9	60.4	64.5	67.9	70.8
7B	46.5	59.5	65.3	74.5	80.7	81.5
8A	50.3	66.4	72.4	78.2	85.2	86.6
8B	55.5	78.4	84.8	87.8	89.5	90.1

【0155】

以下の日数での蛋白質放出率(%)

	1	4	8	11	15	18
9A	16.2	21.8	24.6	40.1	43.9	
9B	27.2	37.3	41.6	45.0	54.1	
10A	29.6	41.3	46.2			
10B	33.8	51.1	59.9	64.6	69.3	
11A	45.9	60.1	65.7			
11B	42.0	66.0	72.9	74.6		

【0156】

以下の日数での蛋白質放出率

	1	3	8	11	15	18
--	---	---	---	----	----	----

12A*	56.3	84.4	99.4	99.4		
12B*	51.7	74.9	89.3	93.8	99.2	
13A*	37.3	67.7	85.8	108.6		
13B*	36.2	75.7	95.2	104.0	105.2	
14A*	28.6	47.2	55.6	74.3		
14B*	24.2	48.3	61.0	77.8	81.6	
15A*	58.1	84.4	96.0	96.2		
15B*	50.3	111.3	127.2	129.7	131.9	132.3

【0157】

以下の日数での蛋白質放出率

	1	4	8	11	15	18
16	6.2	6.7	6.8	6.9	6.9	6.9
17A	22.6	32.7	41.0	43.1	45.6	46.5
17B	26.2	36.3	42.8	44.8	48.2	49.3

*放出値はアミノ酸分析でなく重量で計算した組成物の蛋白質含量を用いて算出した。

【0158】実施例18

PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF
(ラクチド：グリコリド80：20)を含有する連続放出型
製薬組成物

A. 氷酢酸法(5.52%の蛋白質装填率)

158.91mgのポリラクチド(80重量%のd, 1-ラクチド/
20重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7952,
多分散度2.01)を2.0mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解
させた。41.90 mgのPEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}]
hu G-CSFの凍結乾燥製剤を別量2.0 mlの
氷酢酸に溶解させた。これら2種の溶液を混合し、別量
4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。
得られる溶液を液体窒素中に落下させることにより直ちに
凍結させ、一夜凍結乾燥した。75℃に加熱した定盤を
有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合
し、成形して約80mgの重量を有するデボとした。次いで
これらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02
重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0mlを含有する
プラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。
一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充し
た。PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF
の放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の
累積放出を算出した。

組成物からの蛋白質の放出

日 数	放出率 (%)
1	10.41
4	17.36
7	21.73
11	24.47
14	27.67
18	30.69

【0159】実施例19

PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF
[80% (ラクチド：グリコリド50：50) / 20%メチルポ
リエチレングリコール2000]を含有する連続放出型製薬
組成物

A. 氷酢酸法(5.23%の蛋白質装填率)

159.87mgのハイドロゲル(80.7重量%のd, 1-ラクチド
/グリコリド共重合体、19.3重量%の2000MePEG)を2.0
mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。40.26mgのPE
G 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの凍
結乾燥製剤(26.46重量%の蛋白質)を別量2.0 mlの氷酢
酸に溶解させた。これら2種の溶液を混合し、別量4×
0.5ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得ら
れる溶液を液体窒素に落として直ちに凍結させ、一夜凍
結乾燥した。60℃に加熱した定盤を有する油圧プレス
を用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して約
80mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボ
を、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%
のナトリウムアジドの溶液2.0mlを含有するプラスチッ
ク製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で
水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000
-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水
性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算
出した。

51

組成物からの蛋白質の放出

日 数	放出率 (%)
1	24.57
4	40.85
8	67.16
11	79.91
15	91.57

【0160】実施例20

PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF [80% (ラクチド/グリコリド 100:0)/20%メチルポリエチレングリコール2000]を含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法 (5.23%の蛋白質装填率)

159.70gのハイドロゲル (82.5重量%のポリd, 1-ラクチド、17.5重量%の2000MePEG)を2.0mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。39.50 mgのPEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの凍結乾燥製剤 (26.46重量%の蛋白質)を別量2.0 mlの氷酢酸に溶解させた。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液を液体窒素に落として直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。60°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して約70mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。

組成物からの蛋白質の放出

日 数	放出率 (%)
1	25.19
4	63.52
8	86.20
11	93.67
15	97.50
18	98.88

【0161】実施例21

PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF (ラクチド:グリコリド50:50)を含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法 (4.14%の蛋白質装填率)

160.34mgのポリラクチド (50重量%のd, 1-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9827, 多分散度2.18)を2.0mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。40.73 mgのPEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの凍結乾燥製剤を別量2.0 mlの氷酢酸に溶解させた。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。

52

得られた溶液を液体窒素に落として直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。60°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、成形して約60mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。

組成物からの蛋白質の放出

日 数	放出率 (%)
1	18.05
4	40.00
8	57.47
11	66.18
14	72.06
18	77.77

【0162】実施例22

PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF (ラクチド:グリコリド75:25)を含有する連続放出型製薬組成物

氷酢酸法

161.46mgのポリラクチド (75重量%のd, 1-ラクチド/25重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量12938, 多分散度1.81)を2.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。39.03 mgのPEG TG50の凍結乾燥製剤を別量2.0 mlの氷酢酸に溶解させた。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られた溶液を液体窒素に落として直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。75°Cに加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、成形して約80mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37°Cで貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。

組成物からの蛋白質の放出

日 数	放出率 (%)
1	7.82
4	12.27
7	15.46
11	17.25
14	19.38
18	21.06

【0163】実施例23

PEG 5000-[Met⁻¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF
(ラクチド:グリコリド100:0)を含有する連続放出型
製薬組成物

氷酢酸法(5.37%の蛋白質装填率)

158.67mgのポリラクチド(100重量%のd, l-ラクチド/
0重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量9042、
多分散度1.96)を2.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解
させた。40.42 mgのPEG 5000-[Met⁻¹,Arg¹¹,Ser
17,27,60,65] hu G-CSFの凍結乾燥製剤を別量2.0 mlの
氷酢酸に溶解させた。これら2種の溶液を混合し、別量
4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。
得られる溶液を液体窒素に落として直ちに凍結させ、一
夜凍結乾燥した。75℃に加熱した定盤を有する油圧プレ
スを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、成形して約70
mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、
オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナ
トリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製
の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性
媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[M
et⁻¹,Arg¹¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒
体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出し
た。

組成物からの蛋白質の放出

日 数	放出率 (%)
1	13.02
4	22.46
7	29.44
11	33.15
14	36.34
18	41.31

【0164】実施例24

PEG 5000-[Met⁻¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFを含有する連続
放出型製薬組成物-水性法

i) 組成物G(20%の蛋白質装填率)

4.0gのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重
量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7673、多分
散度2.59)を12mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断
下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この
溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)の4 mlを滴
加した。別量60mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物
が生成した。回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去
した。得られる溶液をジクロロメタン/ドリコールドの
浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体
のナトリウム塩を続いて室温で真空下に貯蔵した。

【0165】160.31mgの該重合体のナトリウム塩を2 ml
の蒸留水に分散させた。4.396 mlのPEG 5000-[Met⁻¹,S
er^{17,27}] hu G-CSF(9.1mg/ml)の水溶液を蒸留水で5 mg
/mlにまで希釈し、重合体の塩懸濁物に添加した。別量
4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。
得られる溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で

直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定
盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混
合させ、次いでこの温度で成形して厚さ1 mmのスラブ板
を得た。このスラブ板を切断して約105 mgの重量を有す
るデボとした。次いでこれらのデボを、0.02%のナトリ
ウムアジド含有のオキシドリン緩衝液2 mlを含有する
プラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一
定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充し
た。PEG 5000-[Met⁻¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFの放出は水
性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算
出した。

【0166】ii) 組成物H(20%の蛋白質装填率)

4.0gのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量
%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7791.2、多分
散度2.65)を16mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断
下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この
溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)の4 mlを滴
加した。別量40mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物
が生成した。回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去
した。得られる溶液をジクロロメタン/ドリコールドの
浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体
のナトリウム塩を続いて室温で真空下に貯蔵した。

【0167】89.84 mgの該重合体のナトリウム塩を2 ml
の蒸留水に分散させた。3.33mlのPEG 5000-[Met⁻¹,Ser
17,27] hu G-CSF(9mg/ml)の水溶液を重合体の塩懸濁物
に添加した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス
容器をゆすいだ。得られる溶液をジクロロメタン/ドリ
コールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。
95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾
燥粉末を完全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ
1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約63mg
の重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、0.
02%のナトリウムアジド含有オキシドリン緩衝液2 ml
を含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯
蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液
を補充した。PEG 5000-[Met⁻¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFの
放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積
放出を算出した。組成物G及びHについて累積放出の比
較を図17に示す。

【0168】比較例3

[Met⁻¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFを単独で含有する連続放出
型製薬組成物-水性法

組成物I(20%の蛋白質装填率)

4.0gのポリラクチド(50重量%のd, l-ラクチド/50重量
%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7791.2、多分
散度2.65)を16mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断
下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この
溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mg/ml)の4 mlを滴
加した。別量40mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物
が生成した。回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去

した。得られる溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて室温で真空中に貯蔵した。

【0169】160.20mgの該重合体のナトリウム塩を2mlの蒸留水に分散させた。4,000 mlの[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSF(10.0mg/ml)の水溶液を蒸留水で5mg/mlまで希釈し、重合体の塩懸濁物に添加した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合させ、次いでこの温度で成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約81mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、0.02%のナトリウムアジド含有オキシドリン緩衝液の2mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。組成物Iについての蛋白質の累積放出を図18に示す。

【0170】比較例4

[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFとメチルPEG 5000とを含有する連続放出型製薬組成物－水性法
組成物J（20%の蛋白質装填率）

4.0gのポリラクチド（50重量%のd, l-ラクチド／50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7791.2, 多分散度2.65）を16mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した（イストラル1500ホモジナイザー）。この溶液に重炭酸ナトリウム（20mg/ml）の4mlを滴加した。別量40mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて室温で真空中に貯蔵した。

【0171】119.77mgの該重合体のナトリウム塩を2mlの蒸留水に分散させた。4,000 mlの[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSF(10.0mg/ml)の水溶液を、40.43 mgのメチルPEG 5000含有水溶液で5mg/mlにまで希釈し、重合体の塩懸濁物に添加した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約83mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、0.02%のナトリウムアジド含有オキシドリン緩衝液2mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出

を算出した。組成物Jについての蛋白質累積放出を図18に示す。

【0172】実施例25

PEG 5000-[Met¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物－水性法
組成物K（20%の蛋白質装填率）

4.0gのポリラクチド（50重量%のd, l-ラクチド／50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7791.2, 多分散度2.65）を16mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した（イストラル1500ホモジナイザー）。この溶液に重炭酸ナトリウム（20mg/ml）の4mlを滴加した。別量40mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて室温で真空中に貯蔵した。

【0173】120.8 mgの該重合体のナトリウム塩を2mlの蒸留水に分散させた。3.738 mlのPEG 5000-[Met¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] hu G-CSF(10.7mg/ml)の水溶液を重合体の塩懸濁物に添加した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。80℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ1mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約95mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、0.02%のナトリウムアジド含有オキシドリン緩衝液2mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。組成物Kについての蛋白質累積放出を図19に示す。

【0174】実施例26

PEG 5000-[Met¹,Arg²¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFを含有する連続放出型製薬組成物－水性法

A. 水性法

i) 組成物L（20%の蛋白質装填率）

4.0gのポリラクチド（50重量%のd, l-ラクチド／50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7791.2, 多分散度2.65）を16mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した（イストラル1500ホモジナイザー）。この溶液に重炭酸ナトリウム（20mg/ml）の4mlを滴加した。別量40mlの蒸留水を添加して、微細な白色分散物が生成した。回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる溶液をジクロロメタン／ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて室温で真空中に貯蔵した。

120.5 mgの該重合体のナトリウム塩を2mlの蒸留水に分

散した。3.478 mlのPEG 5000-[Met¹,Arg¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(11.5mq/ml)の水溶液を重合体の塩懸濁物に添加した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。90℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約84mqの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、0.02%のナトリウムアジド含有オキシドリン酸緩衝液2 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000-[Met¹,Arg¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。組成物Lについて蛋白質累積放出を図20に示す。

【0175】比較例5

[Met¹,Glu¹,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] hu G-CSFを単独で含有する連続放出型製薬組成物-水性法組成物M(20%の蛋白質装填率)

4.0gのポリラクチド(50重量%のd, 1-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7673, 多分散度2.59)を12mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mq/ml)の4 mlを滴加した。別量60mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて室温で真空下に貯蔵した。

【0176】160.98mqの該重合体のナトリウム塩を2 mlの蒸留水に分散させた。4.124 mlの[Met¹,Glu¹,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] hu G-CSF(9.7mq/ml)の水溶液を蒸留水で5.0mq/mlにまで希釈し、重合体の塩懸濁物に添加した。別量4×0.5ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。75℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約81mqの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、0.02%のナトリウムアジド含有オキシドリン酸緩衝液の2 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。[Met¹,Glu¹,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。組成物Mについての蛋白質累積放出を図19に示す。

【0177】比較例6

[Met¹,Arg¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFを含有する連

続放出型製薬組成物

組成物N(20%の蛋白質装填率)

2.0gのポリラクチド(50重量%のd, 1-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量7673, 多分散度2.59)を8 mlのジクロロメタンに溶解させ高剪断下に配置した(イストラル1500ホモジナイザー)。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液(20mq/ml)の2 mlを滴加した。別量30mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて室温で真空下に貯蔵した。

【0178】159.99mqの該重合体のナトリウム塩を2 mlの蒸留水に分散させた。3.988 mlの[Met¹,Arg¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSF(10.03mq/ml)の水溶液を蒸留水で5.0mq/mlにまで希釈し、重合体の塩懸濁物に添加した。別量4×0.5 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液をジクロロメタン/ドリコールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。95℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いでこの温度で成形して厚さ1 mmのスラブ板を得た。このスラブ板を切断して約81mqの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、0.02%ナトリウムアジド含有オキシドリン酸緩衝液2 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。[Met¹,Arg¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。組成物Jについての蛋白質累積放出を図20に示す。

【0179】実施例27

PEG 5000 ヒト カルチトニンを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法(5.0重量/重量%の蛋白質装填率)

396.23mqのポリラクチド(50重量%のd, 1-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75)を4.0 mlの無氷酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。2.955 mlのPEG 5000 ヒト カルチトニン(8.46mq/ml)の水溶液を凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの氷酢酸に溶解した。これら2種の溶液を混合し、別量4×1.0 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液を液体窒素に落として直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。75℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで16ゲージの出口を介して押出した。押出物を切断して約10mqの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン酸緩衝液中の0.02重量/容量%のナトリウムアジド溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000 ヒト カルチトニ

ンの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表2参照）。

【0180】B. 水性法

5.0gのポリラクチド（50重量%のd, l-ラクチド/50重量%のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691,多分散度1.75）を20.0mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した（イストラル1500ホモジナイザー）。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液（20mg/ml）の5.00mlを滴加した。別量50mlの蒸留水を添加し微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる分散物をジクロロメタン/ドリ

コールドの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて使用前に室温で真空中に貯蔵した。

【0181】392.62mgの該重合体のナトリウム塩を4.0mlの蒸留水に分散させた。2.955 mlのPEG 5000 ヒトカ*

*ルチトニン（8.46mg/ml）の水溶液を凍結乾燥させ次いで別量2.0 mlの蒸留水に溶解した。別量4×1.0 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液を液体窒素に落として直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。60℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し次いでゲージ16の開口を介して押出した。押出物を切断して約10mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000 ヒト カルチトニンの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表2参照）。

【0182】

表 2

ペプチドの試験管内放出率（GAA法）

日 数	デボA 累積放出率（%）	デボB 累積放出率（%）
1	15.4	10.9
2	15.4	10.9
7	15.4	10.9
8	56.5	41.3
16	66.5	57.2

【0183】

日 数	デボC 累積放出率	デボD 累積放出率
1	6.9	7.9
2	6.9	7.9
7	6.9	7.9
9	27.9	27.9
16	45.4	31.6

【0184】

ペプチドの試験管内放出率（水性法）

日 数	デボA 累積放出率（%）	デボB 累積放出率（%）
1	20.9	24.7
2	30.5	35.6
7	41.5	57.1
8	51.3	72.3
16	65.0	88.3

【0185】

	デボC 累積放出率（%）	デボD 累積放出率（%）
1	26.3	20.5
2	32.0	25.2
7	46.6	36.4
8	53.9	42.2
16	60.6	49.9

【0186】実施例28

非ベギル化のヒト カルチトニンを含有する連続放出型製薬組成物

A. 氷酢酸法（5重量／重量％の蛋白質装填率）

473.50mgのポリラクチド（50重量％のd, l-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75）を4.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。25.56 mgのヒト カルチトニンの凍結乾燥製剤もまた別量2.0mlの氷酢酸に溶解させた。これら2種の溶液を混合し、別量4×2.0 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液を液体窒素に落とすことにより直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。75℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで16ゲージの開口を通して押出成形した。押出物を切断して約10mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に溶かした0.02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。ヒトカルチトニンの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。分析は1日、2日、7日、8日及び16日目に行ったがこの期間に亘って有意な程の放出の徴候は検出されなかった。

【0187】B. 水性法（5.0重量／重量％の蛋白質装填率）

5.0gのポリラクチド（50重量％のd, l-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75）を20.0mlのジクロロメタンに溶解させ、高剪断下に配置した（イストラル1500ホモジナイザー）。この溶液に重炭酸ナトリウムの水溶液（20mg/ml）の5.00mlを滴加した。別量50mlの蒸留水を添加し、微細な白色分散物が生成した。次いで回転蒸発器を用いてジクロロメタンを除去した。得られる分散物をジクロロメタン／ドリコールの浴中で直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。この重合体のナトリウム塩を続いて使用前に室温で真空下に貯蔵した。

【0188】474.84mgの該重合体のナトリウム塩を4.0 mlの蒸留水に分散させた。25.65 mgのヒトカルチトニン*

*の凍結乾燥製剤も2.0 mlの蒸留水に溶解させた。得られる溶液を前記懸濁物に添加し、混合した。別量4×1.0 ml分の蒸留水を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液を液体窒素中に落下させて直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。55℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いでゲージ16の開口を介して押出成形した。抽出物を切断して約10mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液に入れた0.02重量／容量％のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。ヒトカルチトニンの放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。分析は1日、2日、7日、8日及び16日目に行ったが、この期間に亘って有意な程の放出の徴候は検出されなかった。

【0189】実施例29

PEG 5000インターロイキン-2（PEG 5000 IL-2）を含有する連続放出型製薬組成物

20 氷酢酸法（20重量／重量％の蛋白質装填率）

113.42mgのポリラクチド（50重量％のd, l-ラクチド／50重量％グリコリド共重合体、重量平均分子量10691, 多分散度1.75）を2.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。4.88mlのPEG 5000 IL-2（7.35mg/ml）の水溶液を凍結乾燥させ次いで別量1.0 mlの氷酢酸に溶解した。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液を液体窒素中に落下させて直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。75℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、成形して約30mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキシドリン緩衝液中の0.02重量／容量％のナトリウムアジド溶液2.0 mlを含有するプラスチック製の小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。PEG 5000IL-2の放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した（以下の表3参照）。

【0190】

表 3

ペプチドの試験管内放出率

日 数	デ ボ A 累積放出率（％）	デ ボ B 累積放出率（％）
1	31.3	37.7
2	41.8	41.1
4	43.9	45.8
8	45.5	47.0
16	46.5	47.7

【0191】実施例30

非ベギル化インターロイキン-2（IL-2）を含有する連続放出型製薬組成物氷酢酸法（20重量／重量％の蛋白質装

填率）

50 54.90 mgのポリラクチド（50重量％のd, l-ラクチド／50重量％のグリコリド共重合体、重量平均分子量10691,

多分散度1.75)を4.0 mlの無水酢酸無含有氷酢酸に溶解させた。45.09 mgのIL-2の凍結乾燥製剤も別量1.0 mlの氷酢酸に溶解させた。これら2種の溶液を混合し、別量4×0.5 ml分の氷酢酸を用いてガラス容器をゆすいだ。得られる溶液を液体窒素中に落下させて直ちに凍結させ、一夜凍結乾燥した。80℃に加熱した定盤を有する油圧プレスを用いて凍結乾燥粉末を完全に混合し、次いで成形して約30mgの重量を有するデボとした。次いでこれらのデボを、オキソイド緩衝液中の0.02重量/容量%のナトリウムアジドの溶液2.0 mlを含有するプラスチックの小ビンに装入し、37℃で貯蔵した。一定の間隔で水性媒体を取出し、新たな緩衝液を補充した。IL-2の放出は水性媒体のhplc分析により測定し、蛋白質の累積放出を算出した。1、2、4、8及び16日目に分析を行ったが、この期間に亘って顕著な放出は検出されなかった。

【0192】参考例1

メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹] ヒト G-CSFの調製

A. [Met⁻¹] ヒト G-CSFの調製

a) [Met⁻¹] ヒト G-CSFについての遺伝子の調製

図2及び図3のポリペプチド(ヒト G-CSF)の amino 酸配列をエンコードするDNA塩基配列(図2及び図3及びSEQ ID No 45)を下記の点を考慮して設計した:

【0193】1) プラスミド中の適当な部位での連結を可能にするための一重鎖粘着末端。

2) 後続の遺伝子操作を促進するための、遺伝子全体についての一連の制限エンドヌクレアーゼ配列。

3) 翻訳停止コドン。

4) コード領域の5'-末端のコドンはA/Tが豊富になるように選択した。他のコドンはE.coliの発現に好ましいコドンとして普通に選択した。遺伝子は18個のオリゴヌクレオチド(SEQ ID No 1-SEQ ID No 18)から集成し、これを後記する。

【0194】オリゴヌクレオチドの調製

後に示すオリゴヌクレオチド配列をApplied Biosystems 380A DNA シンセサイザー上で、5'-ジメトキシトリチル塩基-保護ヌクレオチド-2'-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイトと0.2 ミクロモルスケール上で孔径制御(pore-controlled)ガラス支持体に連結された保護ヌクレオチドからApplied Biosystems Inc.によって提供されるプロトコールに従って調製した。

【0195】別法として、オリゴヌクレオチド配列は“Oligonucleotide Synthesis, a Practical Approach”(M. T. Gait編、IRL Press, Oxford, Washington D C, 35~81頁)にAtkinson及びSmithによって記載されたマニュアル法によって調製し得る。

【0196】詳しくは、Applied Biosystems 380A DNA シンセサイザーを使用するオリゴヌクレオチド配列の調製は下記のごとく行われる: 各オリゴヌクレオチドを固

体支持体から剥離しついで全ての保護基を除去した後、水(1 ml)に溶解した。3 M酢酸ナトリウム(pH 5.6: 40 μl)とエタノール(1 ml)の溶液をオリゴヌクレオチド溶液(400 μl)に添加しついで混合物を-70℃で20時間貯蔵した。得られた沈澱を遠心分離(13,000 rpm, 10分間)により回収しついでベレットをエタノール: 水(7: 3)(200 μl)で洗浄しついで真空中で短時間乾燥した後、水(15 μl)及びホルムアルデヒド/染料混合物(10 mM NaOH, 0.5 mM EDTA, 0.01% ブロムフェノールブルー, 0.01% キシレンシアノール, 80%ホルムアルデヒド)中に溶解した。

【0197】オリゴヌクレオチドを8.3Mの尿素を含有する50 mM トリス-硼酸塩(pH 8.3)中の10%ポリアクリルアミドゲル上で精製した。正しい長さのオリゴヌクレオチドをUV射影(UV shadowing)(Naranjo等, 1979, "Methods in Enzymology", Vol 60, 90-98)-通常、最も顕著なバンドーにより同定し、ゲルから切り取りついで5 mM トリス硼酸塩(pH 8.3)中で300 mV で3~4時間、電気泳動した。水溶液をn-ブタノールで処理することにより(混合、回転及び上部有機層の除去)、約200 μlまで濃縮した。精製オリゴヌクレオチドをエタノール(2.5容量)を添加することにより0.3 M酢酸ナトリウム溶液から-70℃で20時間沈澱させた。

【0198】遺伝子の集成(assembly of gene)

オリゴヌクレオチドSEQ ID No 2-SEQ ID No 17(各々、400 pM)(後に定義)を、ATP(800 pM, 25 pM)のガンマー-³²P ATPを含有)、100 μM のスベルミジン、20 mMのMgCl₂、50 mMのトリス-HCl(pH 9.0)及び0.1 mMのEDTAを含有する溶液25 μl中で、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(3.6単位)を使用して37℃で2時間リン酸化(phosphorylate)した。溶液を100℃で5分間加熱して反応を終結させついで表1に示すとき対にして(in pair)混合して、重複体(duplex)A~Iを得た(オリゴヌクレオチドSEQ ID No 1及びSEQ ID No 18(25 μl中、400 mM)はリン酸化しないで使用した)。0.3 M酢酸ナトリウム(pH 5.6, 200 μl)とエタノール(850 μl)を添加し、重複体を-20℃で20時間沈澱させた。得られた沈澱を遠心分離により回収し、エタノール: 水(7: 3)で洗浄しついで水(50 μl)に溶解した。オリゴヌクレオチドの対を、最初、溶液を沸騰水浴中で100℃で2分間加熱することによりアニーリングした。ついで浴を40℃までゆっくり(約4時間)冷却させた。3対の重複体を含有する溶液を一緒にしてグループI~IIIを得(表1参照)、凍結乾燥しついでT4 DNAリガーゼ(1単位; BRL)、50 mMのトリス(pH 7.6)、10 mM塩化マグネシウム、5%(w/v) PEG 8000, 1 mM ATP, 1 mM DTT(BRL, "Focus", Vol. 8, No 1, Winter 1986)を含有する溶液30 μlに溶解しついでDNAを30℃で5分間ついで16℃で20時間連結した。3 M酢酸ナトリウム(20 μl)と水(150 μl)を添加しついでエタノール(750 μl)を添加することにより生成物を沈澱させつ

いで-20℃で20時間冷却した。沈澱を遠心分離により捕集し、エタノール(1ml)で洗浄し、水(15μl)及びホルムアルデヒド/染料混合物(10μl)中に溶解しついで50mMトリス硼酸塩(pH8.3)、1mM EDTA 及び8.3M尿素中の10%ポリアクリルアミドゲル上で精製した。適当な長さのストランド(173~186塩基)についてのバンドをオートラジオグラフィーにより同定しついで個々のオリゴヌクレオチド配列について述べたとき方法で単一ゲルスライスから電気溶離することにより単離した。DNA 鎖*

表 1

重複体	オリゴヌクレオチド	塩基の数	
		トップストランド	ボトムストランド
A	SEQ ID No 1 + SEQ ID No 2	62	64
B	SEQ ID No 3 + SEQ ID No 4	60	60
C	SEQ ID No 5 + SEQ ID No 6	48	51
D	SEQ ID No 7 + SEQ ID No 8	63	60
E	SEQ ID No 9 + SEQ ID No 10	63	63
F	SEQ ID No 11 + SEQ ID No 12	60	63
G	SEQ ID No 13 + SEQ ID No 14	63	60
H	SEQ ID No 15 + SEQ ID No 16	60	60
I	SEQ ID No 17 + SEQ ID No 18	55	53
I	A+B+C	170	175
II	D+E+F	186	186
III	G+H+I	178	173

【0200】b) [Met⁻¹] ヒトG-CSF についての合成遺伝子のクローニング。

上記の合成遺伝子をプラスミドベクター pSTP1(Windass等、Nucleic Acid Research(1983), Vol10, p6639)中にクローンした。ベクターを調製するために、10μgのSTP1を水(37.5μl)及び10x制限緩衝液(restriction buffer)(4.5μl)(BCL)中に溶解した。制限エンドヌクレアーゼSalI(3μl)(BCL, 8単位/μl)を添加しついで混合物を37℃で1時間、超らせん及びニック型(supercoiled and nicked form)プラスミドと比べて線状化(linearised)プラスミドが主成分になるまでインキュベートした。DNAをエタノールを用いて4℃で30分間沈澱させ、エタノール:水(7:3)で洗浄しついで水(39.5μl)及び10x緩衝液(4.5μl)(BCL)中に溶解した。制限エンドヌクレアーゼEcoRI(1μl)(BCL, 90単位/μl)を添加しついで混合物を、大きなEcoRI-SalI断片が主成分になるまで37℃で1時間インキュベートした。DNAを-20℃で20時間沈澱させ、エタノール:水(7:3)で洗浄しついで水(20μl)に溶解した。

【0201】大きなRcoRI-SalI断片を1%調製アガロースゲル上で精製し、電気溶離し、前記したとき方法で沈澱させついで水(20μl)に溶解させた。合成遺伝子を連結させるために、ベクターDNA(EcoRI-SalI断片溶液、2μl)、合成遺伝子(前記の水溶液5μl)、5×リガーゼ緩衝液(6μl - 250mM トリス pH 7.6、50 mM MgCl₂、2.5w/v% PEG8000、5mM ATP、5mM DTT、BRL製)、水

*を最初、水溶液(50μl)を100℃で2分間加熱しついで40℃で4時間、放冷することによりアニーリングした。

【0199】グループI、II及びIIIを、これらのグループの調製について述べたものと本質的に同一の方法で連結して、図10に示す遺伝子配列を生成物として得た。沈澱後、遺伝子を、T4ポリヌクレオチドキナーゼを使用して、先に個々のオリゴヌクレオチドについて述べたと同様の方法で燐酸化しついで水(20μl)に溶解した。

(15μl)及びT4DNAリガーゼ(2μl, 1U/μl)の混合物を16℃で4時間インキュベートした。DNA混合物(非稀釈連結混合物1μl又は水で5倍に希釈した連結混合物2μl)を直接使用して、*E. coli*菌株HB101を形質転換した。DNA混合物(1又は2μl)を氷上のコンピテント*E. coli* HB 101細胞(20μl, BRL)に添加し、混合物を氷上で45分間インキュベートしついで42℃で45秒、熱衝撃処理を行った。氷上で2分後、100μlのSOC緩衝液(バクトトリブトン2%; 酵母エキス0.5%; NaCl 10mM; KCl 2.5mM; MgCl₂, MgSO₄ 20mM(各々10mM); グルコース20mM)を添加しついで混合物を37℃で1時間インキュベートした。懸濁液のアリコート(50μl/ml)のアンピシリンを含有するL-プレート上に載置したManiatis等による“Molecular Cloning; A Laboratory Manual”(Cold Spring Harbor)に記載されまた英国特許出願第8502605号明細書に記載されている標準的方法を使用して、形質転換細胞をコロニーハイブリダイゼーション分析により、クローンされた合成遺伝子についてスクリーニングした。全部で100個のコロニーをフィルター(Schleicher及びSchuell)上にストリークし、37℃で20時間生長させ、溶菌しついでベーキング(bake)した。オリゴヌクレオチド配列SEQ ID No1からランダム-ラベルキット(random-label kit)(Pharmacia)を使用して調製した放射性プローブを使用して、フィルターを65℃で20時間、ハイブリダイドした。正のハイブリダイゼーションシグナルを与える5個のコロニー1~5を、L-ブイヨン

中で37℃で20時間、小規模で(100ml) 生長させついでプラスミドDNAを、Maniatis等による“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”(Cold Spring Harbor)に記載される方法と実質的に同一の方法で塩化セシウム密度勾配遠心により調製した。

【0202】DNAの塩基配列の決定はSanger等により、“Proc. Nat. Acad. Sci. USA”. 74, 5463-5467(1977) *

表 2

コード	開始部位(priming site)
SEQ ID No 19	214-234 トップストランド
SEQ ID No 20	333-353 トップストランド
SEQ ID No 21	375-395 ボトムストランド
SEQ ID No 22	207-227 ボトムストランド
SEQ ID No 23	69-93 ボトムストランド

【0203】クローン5からのプラスミドDNAは図6に示すDNA塩基配列を含有していた。このプラスミド(pAG88)を使用して標準の手順に従って下記のE.coli菌株のコンピテント細胞を形質転換した：

HB101

CGCS 6300(以下においてはMSD522とも称する)

【0204】E.coli菌株HB101及びMSD522(CGCS 6300)は自由に入手し得る。すなわち例えばこれらの菌株は米国エール大学のE.coli Genetic Stock Centreから入手し得る。更にE.coli HB101は例えばGIBCO Limited (Unit 4, Cowley Mill Trading Estate, Longbridge Way, Uxbridge, UB8 2YG, Middlesex, England)又はGIBCO Laboratories, Life Technologies Inc., 3175 Staley Road, Grand Island, NY14072, USA. により供給されるBRLから得られる。

【0205】菌株HB101の遺伝子型は前記“Molecular Cloning - A Laboratory Manual”にSup E44 hsd S20 (r⁺ m⁺) rec A 13 ara-14 F⁻ leu 6 Thi-1 pro A2 lacY 1 gal K2 rps L20 xyl⁻ 5 mtl⁻ と記載されている。MSD522(CGCS 6300)の遺伝子型は参考例12に記載されている。

【0206】c). [Met⁻] ヒトG-CSFの遺伝子の発現ベクター中へのクローニング

上記遺伝子を参考例3(c)に記載の方法でプラスミドPIC10020中にクローンして、発現プラスミドPIC1056を得た。

【0207】d) 発酵(fermentation)

プラスミドPIC1056を参照例3(e)に記載の方法で形質転換しかつ発酵を行って、[Met⁻] ヒトG-CSFを発現させた。

e) 精製

PCT特許公告第W087/01132号の第48頁及び第49頁に記載される[Met⁻] ヒトG-CSFを大量に生成させるために開発された第2の精製法に記載の方法に従って精製を行い最後の透析を磷酸緩衝溶液に対して行った。

【0208】B. メチルポリエチレングリコールで変性

* f) に記載される標準チェインターミネーター法により、シクイナーゼ(Sequinase) (商標) キット(United State Biochemical Corporation)を使用して行った。オリゴヌクレオチドSEQ ID No 19~SEQ ID No 23(後に定義；表2参照)を塩基配列決定プライマー(sequencing primer)として使用した。

された[Met⁻] ヒトG-CSFの調製

前記Aに記載の方法で調製した[Met⁻] ヒトG-CSFの、20mM酢酸ナトリウム、37mM塩化ナトリウム、pH 4中の溶液を、アミコン(Amicon)YM10膜(MW カットオフ10kDa)上での限外濾過により、8mg/mlになるまで濃縮した。この溶液に等容量の0.8M硼酸ナトリウム(pH8.8)を添加し、20についてMW=約5000のメチルポリエチレングリコール p-ニトロフェニルカーボネート(Sigma Chemicals社製)([Met⁻] ヒトG-CSF 1モル当り100等量)を水に溶解して添加した。穏やかに攪拌しながら20℃で3時間反応を行いついで1Mエタノールアミン塩酸塩pH 8.0(活性化メチルポリエチレングリコール1モル当り、10等量)を添加することにより反応を停止した。1M酢酸を添加することにより反応混合物を直ちにpH 5.4に調整し、20mM酢酸ナトリウム及び100mM NaCl(pH5.4)により500 mlに稀釈した。混合物を、SIY30膜(MW カットオフ30kDa)を取付けたアミコン(Amicon)CH2A-IS スパイラルカートリッジシステムを使用して、黄色p-ニトロフェノールが残留液(retentate)中に認められなくなるまで、10lの同一の緩衝液に対して透析濾過(diafilter)した。残留液を約300mlに濃縮し、20mM酢酸ナトリウム、100mM NaCl, NaCl, pH5.4を用いて300mlに再稀釈した。この操作を4回繰返しそして生成物を最後に約25mlに濃縮した。濃縮物を20mM酢酸ナトリウム、100mM NaCl, pH 5.4で平衡化したウルトロゲルAcA54のカラム(5×90cm)上でクロマトグラフィーにかけた。変性タンパク質を含有するフラクションを、沃素/沃化カリウム滴定(CR Acad. Sci. Paris 274, 1617, 1972)により280nmにおけるタンパク質とメチルポリエチレングリコールを監視することによって同定し、プールし、水に対して徹底的に透析した。最終生成物をアミコンYM30膜上で限外濾過し、無菌状態で0.22μm フィルターを通して濾過し、以後に使用するために4℃で貯蔵した。

【0209】最終変性生成物についてのSDS-PAGEは未変

性の [Met⁻¹] ヒト G-CSF は残留していないことを示した; 全ての生成物は高い MW ストリーク (high MW streak) として行動する。沃素/沃化カリウム滴定による濾液と残留液の分析結果は、YM30 膜 (MW カットオフ 30 kDa) 上で pH 5.4 で透析濾過を反復することにより、タンパク質非結合メチルポリエチレングリコールの全てが効果的に除去されることを示した。最終生成物はタンパク質 1 モル当り、共有結合したメチルポリエチレングリコールを約 4 モル含有していた。非変性誘導体の比活性、 0.8×10^9 U/mg は、変性生成物においては 0.2×10^9 U/mg (25 %) に低下していた。この生成物は完全に安定であり、10 mg/ml (タンパク質による) までにおいて、溶解した状態で、37°C で 14 日間に亘って、比活性に変化は認められなかった。この参考例においては、二量体化を防止するか又は少なくとも最小限にするために、[Met⁻¹] ヒト G-CSF の溶液の pH は、ペグリル化を行う前は注意深く制御した。

【0210】参考例 2

メチルポリエチレングリコール 5000 で変性した [Met⁻¹] ヒト G-CSF の調製

下記の方法で [Met⁻¹] ヒト G-CSF の精製を行ったこと以外、参考例 1 と同様の方法を繰返した。凍結細胞ペースト (500 g) を溶解しついで粗ベレットフラクションを分離し、洗浄しついで参考例 4 (後記参照) に述べる方法で可溶化した。サルコシル可溶性抽出物を 30,000 x g で 30 分間遠心分離することにより清澄化した。1 l の上澄液に攪拌しながら、4°C で 1 l のアセトンを添加した。10 分後、沈澱したタンパク質を 15,000 x g で 30 分間遠心分離することにより捕集し、上澄液を廃棄した。ベレットを PT A20 プローブを取付けたポリトロン (Polytron) PT10-35 ホモジナイザーを使用して、40 mM 酢酸ナトリウム、6 M グアニジン塩酸塩、pH 4.0 (500 ml) 中に再溶解しついで 4°C で 1 時間攪拌しついでコロジオンチューブ (Spectrapor, MW カットオフ 6 ~ 8 kDa) 中で 20 mM 酢酸、pH 5.4 に対する徹底透析を行った。沈澱したタンパク質を 15,000 x g で 3 分間の遠心分離により除去し、上澄液を 20 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.4 で平衡化した CM セルロース (Whatman C M52) の 50 ml カラム上に通送した。カラムを溶離液の E₁ が基準線 (baseline) に降下するまで同一の緩衝液で洗浄しついでカラム容量の 4 倍の量の、20 mM の NaCl を含有する 20 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.4 で洗浄した。[Met⁻¹] ヒト G-CSF を含有する生成物フラクションを 20 mM 酢酸ナトリウム中の 37 mM NaCl、pH 5.4 で溶離し、フラクションをブールしついで直ちにメチルポリエチレングリコール 5000 で変性するか又は後に使用するまで -20°C で貯蔵した。

【0211】参考例 3

メチルポリエチレングリコール 5000 で変性した [Met⁻¹, Ser^{17,27}] ヒト G-CSF の調製

A. ヒト [Met⁻¹, Ser^{17,27}] G-CSF の調製

参考例 1 の工程 a) 及び b) を繰返した; 但し下記のごとき変更を行った; オリゴヌクレオチド SEQ ID No. 1, 2, 3 及び 4 の代りに、それぞれ、SEQ ID No. 24, 25, 26 及び 27 (後記参照) を使用した。

【0212】C) [Met⁻¹, Ser^{17,27}] ヒト G-CSF についての遺伝子の発現ベクター中へのクローニング。

前記した遺伝子 (図 4 及び図 5 参照) をプラスミドベクター pIC10020 中にクローンした。このベクターは PAT153 ベースプラスミドであり、651 bp EcoRI-AccI 領域が、

(1) 合成 *E. coli* trp プロモーター及び trp リーダーリボソーム結合部位

(2) 翻訳開始コドン、

(3) KpnI, BamHI, XbaI, SalI, PstI, SphI 及び Hind II についての部位を含有する、M13mp18 から誘導された多重制限酵素認識配列 (multiple restriction enzyme recognition sequence)、

(4) 合成転写停止配列、

からなる 167 bp EcoRI-ClaI 断片 (SEQ ID No 47) によって置換されている。この領域の DNA 塩基配列は図 1 に示されている (SEQ ID No 44 も参照)。

【0213】pIC10020 発現ベクターを 10 mM トリス HCl (pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム中で KpnI (BCL) を使用して完全に切断 (digest) した。この DNA を 0.3 M の酢酸ナトリウムを含有する溶液から、エタノールを使用して -20°C で沈澱させついで T4 DNA ポリメラーゼを用いて 37°C で 10 分間、下記のごとく処理することにより 3' - 粘性末端を除去した。:

水 (16 µl) 中の DNA (1 µg)

10X T4 ポリメラーゼ緩衝液 (2 µl)

0.33 M トリスアセテート pH 7.9

0.1 M 酢酸マグネシウム

0.66 M 酢酸カリウム

5 mM ジチオトレイトール

1 mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA PENTAX フラクション V)

2 mM dNTP 混合物 (1 µl)

T4 DNA ポリメラーゼ (1 µl; 2.5 単位/µl BCL)

【0214】水 (80 µl) を添加し、混合物をフェノール/クロロホルム (100 µl) で抽出しついでクロロホルム (100 µl) で抽出した。3 M 酢酸ナトリウム (10 µl) を添加した後、DNA をエタノール (250 µl) を用いて -20°C で沈澱させついで 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂、及び 10 mM トリス HCl (pH 7.5) 中で SalI (BCL) を用いて完全に切断した。Kpn-ブランチ末端 SalI ベクター (Kpn-blunt ended to SalI vector) を 0.7 % のアガロースゲルから精製しついで製造業者 (BioL 01 USA) の推奨している操作法に従ってジェネクリーン (商標) を使用することにより単離した。

【0215】合成遺伝子を下記の方法により pSTP1 ベクターから単離した。ベクターを 100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、及び 10 mM トリス HCl (pH 7.5) 中で ScaI 及び SalI (両方

共BCL製)で切断した。530bp断片を0.7%アガロースゲルから精製しついで製造業者(Bio101)の推奨する方法に従ってジェネクリーン(商標)を使用して単離した。

【0216】連結(ligation)を行うために、50mMトリスHCl(pH7.6)、10mM MgCl₂、1mM ATP、1mM DTT、5w/v% PEG 8000及びT4 DNA リガーゼ(2単位; BRL)を含む溶液20μl中の、ScaI-SaI 遺伝子断片(50ng)とpICI0020ベクター断片(100ng)の混合物を16°Cで20時間インキュベートした。得られた混合物をコンピテント *E. coli* HB101細胞(BRLより供給)を形質転換するのに使用した。形質転換細胞(transformant)を50μg/mlのアンプシリンを含有するレーアガープレート上での生長により選択しそして³²P 標識プローブ(SEQ ID No.24)を使用するコロニーハイブリダイゼーションにより、遺伝子の存在についてスクリーンした(screen)。プラスミドDNAを6個の正にハイブリダイドしている(positively hybridising)コロニーから調製し、塩化セシウム密度勾配遠心法(centrifugation in a caesium chloride gradient)により精製しそして塩基配列をチェインターミネーター法(dideoxy sequencing)により確認した。この遺伝子を含むプラスミドをpICI 1080と命名した。

【0217】d) [Met⁺, Ser⁺,²⁷] G-CSF についての遺伝子を含む発現カセット(expression cassette)のM13mp18中へのサブクローニング。

参考例7及び8に詳述されているG-CSF 誘導体の調製のための開始点を提供するために、下記のサブクローニングを行った。

【0218】pICI1080からのプラスミドDNA(塩化セシウム密度勾配遠心分離法により精製)をEcoRI及びSaI(BCL)を使用して、製造業者の指示に従って完全に切断した。trp プロモーターと[Met⁺, Ser⁺,²⁷] G-CSF 遺伝子を含む小さいEcoRI-SaI断片をジェネクリーン(商標)を使用して0.7%アガロースゲルから単離した。この断片をEcoRI-SaI切断M13mp18ベクター(Amersham Internationalにより供給されるDNA; BCLからの酵素)中にクローンした。断片をBRL T4 DNAリガーゼ(前記したもの)を使用して5X BRLリゲーションバッファー中で連結した。連結混合物を使用してコンピテント *E. coli* TGI細胞(“Molecular Cloning-A Laboratory Manual” - Maniatis 等、Cold Spring Harborに記載されるMandel及びHigaの塩化カルシウム法に従ってコンピテントにせしめた)をトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、DMF中の2% X-Galと200μlのログフェーズ(log phase) *E. coli* TGI細胞を含有するTYトップアガー(topagar)中に懸濁させ、2xTYアガープレート上に載置した[TYトップアガー-8gのバクトトリブトン(Bactotryptone)、5gの酵母エキス、5gのNaCl、3.75gのバクトアガー(Bacto-agar)及び500mlの殺菌水; TYプレート-8gバクトトリブトン、5g酵母エキス、5g NaCl、7.5gバクトアガー、500ml 殺菌

水)4個の白色ブランクをTYブロス(8gのバクトトリブトン、5gの酵母エキス、5gのNaCl及び500mlの殺菌水)のアリコート中の4x2mlの1% *E. coli* TGI細胞中に装入し、37°Cで6時間、生長させた。2mlの培養基を0.5mlと1.5mlのアリコートに分割した。バクテリアをエッペンドルフ(Eppendorf)(商標)マイクロフュージ(microfuge)中で溶液から遠心分離し、上澄液を殺菌エッペンドルフ(商標)チューブに移した。0.5mlのアリコートをファージストック(phage stock)として-20°Cに貯蔵した。1.5mlのアリコートをAmersham International M13sequencing handbookに記載の方法(後記参照)に従って一重鎖DNAを調製するのに使用した。これらのDNA試料の塩基配列の決定をオリゴヌクレオチドSEQ ID No.22, SEQ ID No.23及びM13ユニバーサルシーケンシングプライマー(Universal sequencing primer)を使用して行った。反応はシクイナーゼキット(Sequenase kit)(商標)を使用して、製造業者の指示に従って行った。4個のクローンは全て、[Met⁺, Ser⁺,²⁷] G-CSFについての正しいDNA配列を有していた。

【0219】大規模な一重鎖DNAの調製

1ml当たり200~500μgの一重鎖DNAを調製するために、Amersham International “Oligonucleotide Directed Mutagenesis”に記載の方法を使用した。詳細な手順は下記の通りである。大規模な一重鎖DNAの調製:

A. 1mlファージストックの調製

1. グルコース/最小培地プレートから単一のTGI *E. coli*コロニーを採取する。10mlの2xTY培地中で37°Cで振盪しながら一夜生長させる。10μl~20mlの新しい培地を添加し、37°Cで3時間振盪する。
2. 10ml殺菌培養チューブ内の1mlの2xTY培地に、工程1からの3時間培養株(culture)100μlを接種する(inoculate)。
3. 1mlの培養株(culture)に組換え体ブランク(recombinant plaque)を接種する。
4. 振盪しながら37°Cでインキュベートする。マイクロ遠心分離チューブ(microcentrifuge tube)に移す。
5. 周囲温度で5分間遠心分離する。上澄液を新しいチューブに移す。4°Cで一夜貯蔵する。一夜貯蔵したTGI *E. coli*の培養株を次の工程に供給する。

【0220】B. 100mlファージ培養株(phage culture)の生長

1. 100mlの2xTY培地に一夜放置したTGI培養株(TGI culture), 1mlを接種しついでO.D.500が0.3になるまで37°Cで振盪する。
2. A5(上記参照)からのファージ上澄液1mlを100ml培養株(culture)に添加する。
3. 振盪しながら37°Cで5時間インキュベートする。ついで遠心分離チューブに移す。
4. 4°Cで30分間、5000×gで遠心分離する。
5. 上澄液を清浄な遠心分離チューブに移す。細胞が撒

出される(carryover)ことがないように注意する(RF DNAの調製のためのバクテリアペレット(bacterial pellet)を残留させる)。

6. 2.5M NaCl 中の20w/v %のPEG 6000を0.2 容量、上澄液に添加する。十分に混合した後、4℃で1時間放置する。

7. 4℃で20分間、5000xgで遠心分離する。上澄液を廃棄する。

8. 5000xgで5分間遠心分離し、残留するPEG/NaClの全てを取出用バスツールピペットを使用して除去する。

9. ウイルスペレットを500μlの水(二段蒸留)に再懸濁させついでマイクロ遠心チューブ(1.5ml)に移す。

10. マイクロ遠心分離機中で5分間遠心分離して、残留細胞を除去する。上澄液を新しいマイクロ遠心分離チューブに移す。

11. 上澄液に12.5M NaCl中の20%PEG 200μlを添加し、十分に混合しついで周囲温度で15分間放置する。

12. 5分間遠心分離し、上澄液を廃棄する。

13. 2分間遠心分離する。取出用バスツールピペットを使用して、痕跡のPEG/NaClを全て除去する。

14. ウイルスペレットを二段蒸留水500 μl中に再懸濁させる。

15. 10mMトリス HCl pH8.0で飽和させたフェノール 200 μlと1mMのEDTAを添加。短時間攪拌する(vortex)。

16. 室温で15分間、放置する。

17. 3分間遠心分離する。

18. 上澄液を新しいチューブに移す。

19. 工程15~18を繰返す。

*

LQMSO の組成

KH ₂ PO ₄	
Na ₂ HPO ₄	
NaCl	
カゼイン加水分解物 (Oxoid L41)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	
酵母エキス (Difco)	
グリセリン	
L-ロイシン	
L-スレオニン	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	
チアミン	
FeSO ₄ / クエン酸	
微量元素溶液 (TES)	

ついで発酵を37℃の温度でかつ6M水酸化ナトリウム溶液を自動的に添加することによって制御されている、6.7のpHで行った。溶解酸素張力(dissolved oxygen tension)(dOT)の設定点は50%空気飽和率(air saturation)であり、当初、発酵器の攪拌速度を自動調節することによ

* 20. 500 μl のクロロホルムを添加し、水性相を2回抽出する。

21. 3M酢酸ナトリウム50μlと1mlの無水エタノールを添加し、混合する。

22. ドライアイス及びエタノール浴中に20分間、置く。

23. 15分間、遠心分離する。

24. 各ペレットを1mlの-20℃のエタノールで洗浄。注ぎ出す。

25. ペレットを真空乾燥しついで50μlの二段蒸留水中に添加する。

この方法により100 ~ 200 μg の一重鎖DNA が得られた。

【0221】e) 発酵(培養)(fermentation)

pIC1 1080 をE. coli 菌株MSD 522 (CGSC 6300) (参考例1A(b)で参照されている)に形質転換し、得られた組換え体を精製しそしてグリセリンストック上で-80℃に保持した。培養株(culture)のアリコートをストックから取り出し、L-アンピシリンのアガープレート上にストリークし(streak)、37℃で一夜生長後、単一コロニーを分離した。単一の所望のコロニーを取出しついで10mlのL-アンピシリンブロスに再懸濁させ、直ちにその100 μlを、75mlのL-アンピシリンブロスを含む、10個の250 mlエルレンマイヤーフラスコの各々に接種した。往復振盪機上で37℃で16時間生長させた後、フラスコの内容物をブールし、201 LQMSO 生長培地を含む発酵器に接種するのに使用した。

【0222】

蒸留水中の濃度

g/l

KH ₂ PO ₄	3.0
Na ₂ HPO ₄	6.0
NaCl	0.5
カゼイン加水分解物 (Oxoid L41)	2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	10.00
酵母エキス (Difco)	10.00
グリセリン	35.00
L-ロイシン	2.5
L-スレオニン	0.9
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.03
チアミン	0.008
FeSO ₄ / クエン酸	0.94/0.02
微量元素溶液 (TES)	0.5ml

り制御した。1分当り、容量当り、1容量(WM)に相当する発酵器への空気流率を、当初の20l/分から、発酵器攪拌速度がその最大値の80~90%に到達したとき、50l/分(2.5WM)に増大させた。発酵器の酸素移行速度(oxygen transfer rate)(OTR)は、記載される条件下で50

の OD_{550} に相当する細胞濃度(cell density)より大きい細胞濃度においては、バクテリアの酸素吸収速度(oxygen uptake rate)(OUR)を満足させることができないので、この細胞濃度より大きい細胞濃度における発酵器内のdOTは、バクテリアの酸素吸収速度を制限することにより、50%の空気飽和率に保持した。これは培地を炭素が50%の OD_{550} に制限されるように調製しついで制限炭素源(limiting carbon source)の栄養(feed)を硫酸アンモニウム及び酵母エキスと共に、バクテリアの生長を制限する速度で供給することにより達成した。

【0223】発酵は16時間行い、この間に、光学密度(OD_{550})、細胞の乾燥重量及び細胞内のG-CSFの蓄積を測定するためにサンプルを採取した。G-CSFの蓄積は、当業者に周知のごとく、試料バクテリアの全細胞溶解物(lysate)のクーマシブルー染色SDS-PAGEゲルを走査することにより測定した。 OD_{550} が25に到達したとき、カゼイン加水分解物溶液(100g/lのOxozoid L41)を1.5g/lの割合で発酵器に注入した。

【0224】 OD_{550} が約50に到達したとき、発酵バッチ中の炭素源の供給物が消費され、dOTが50%空気飽和率から急速に上昇した。この時点で、グリセリン(470g/l)、酵母エキス(118g/l)及び硫酸アンモニウム(118g/l)を含有する栄養を、元の速度で発酵器に供給しついで発酵器を最大値の約80%で攪拌しながら、dOTを50%空気飽和率に保持した。約13~14時間後、この栄養バッチ供給を行う代りに、グリセリン(715g/l)及び硫酸アンモニウム(143g/l)だけからなる栄養を供給した。カゼイン加水分解物供給率は全体を通じて1.5g/lの時に保持した。約16時間後、培養液の顕微鏡検査により大部分の細胞内に大きな封入体(inclusion body)の存在が認められたとき、バクテリアをソルバル(Sorval)RC3B遠心分離器上で捕集し(7000g、30分、4°C)、-80°Cで冷凍して保存した。

【0225】f) 精製

冷凍細胞ペースト(500g)をシルバーソン(Silverson)AXR型ホモジナイザーを使用して50mMトリスHCl、25mMEDTA、pH8.0(5l)中に4°Cで再懸濁させた。懸濁液をマントン-ガウリン(Manton-Gaulin)ホモジナイザーを6000psiで3回通過させることにより溶菌し(lyse)ついでソルバルRC3C遠心分離器内でH6000Aローターを使用して5000gで30分間、遠心分離した。上澄液を廃棄し、ベレットフラクションを更に精製する前、-20°Cで貯蔵した。

【0226】ベレットフラクション(60~100g)を解凍しついで5mMEDTA中の1w/v%のデオキシコール酸(ナトリウム塩)、5mMのジチオトレイトール、1mg/mlのナトリウムアジドを含有する50mMのトリスHCl、pH9.0(1200ml)中に、PTA20ブローブを有するポリトロン(Polytron)ホモジナイザーを使用して設定速度5で再懸濁させた。懸濁物を室温で30分間混合しついでソルバルRC5C遠

心分離器中でGSAローターを使用して6500gで30分間遠心分離した。上澄液を廃棄しついでベレットを上記と同じ方法で2回再処理した。次にベレットを水(1l)に2回再懸濁させ、15000gで20分間、遠心分離した。洗浄封入体(inclusion body)を含有する最終ベレットを1mg/mlのナトリウムアジドを含有する50mMトリスHCl、pH8.0(150ml)中の2w/v%N-ラウロイルサルコシナトリウム塩(サルコシル)中で可溶化した。硫酸第2銅を20 μ Mに添加し、混合物を20°Cで16時間攪拌しついでソルバルRC5C遠心分離器中でSS34ローターを使用して30,000gで30分間遠心分離した。誘導体を含有する上澄液を、更に精製する前、50mlのアリコートとして-20°Cで貯蔵した。可溶化された誘導体(20ml)を解凍し、5 μ mフィルターを通過させて粒状物質を除去した。濾液を、1mg/mlのナトリウムアジドを含有する50mMトリスHCl、pH8.0中の0.3w/v%N-ラウロイルサルコシン(Na塩)で平衡化した(equilibrate)ウルトロゲル(Ultroge)AcA54のカラム(5 \times 90cm)に4°Cで通送した。カラムを同一の緩衝液を用いて2.5ml/分の流速で溶離し、10mlのフラクションを捕集した。誘導体タンパク質を含有するフラクションを捕集し(約100ml)、4°Cで貯蔵した。数個のカラムから捕集した誘導体含有フラクションを一緒にし(300~500ml)、S1Y10膜(10kDカッターオフ)を取付けたアミコン(Amicon)CH2A-1Sスパイラルカートリッジダイアフィルタレーション装置を使用して、1mg/mlのナトリウムアジドを含有する10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウムに対して透析した。滞留物(retentate)をソルバルRC5C遠心分離器内でSS34ローターを使用して30000 \times gで30分間遠心分離しついで上澄液をスペクトロポール(Spectropor)6-8kDカッターオフ透析チューブ内で40時間、1mg/mlのナトリウムアジドを含有する100mM塩化ナトリウム、20mM酢酸ナトリウム、pH5.4に対して、この溶液を3回交換して透析した(上澄液300ml当り、8l)。形成された沈殿を30,000 \times gで30分間の遠心分離により除去しついで上澄液を1mg/mlのナトリウムアジドを含有する水に対して24時間透析しついで水に対して、水を6回交換して72時間透析した。最終滞留物を30,000 \times gで30分間遠心分離することにより清澄化し、-20°Cで冷凍貯蔵する(タンパク質濃度約1mg/ml)か又は4°Cで凍結乾燥した。

【0227】N-ラウロイルサルコシン(Na塩)の濃度はダイアフィルタレーションの後には0.001w/v%以下に低下しそして水に対する透析の後には使用したrpHPLC法の検出限界値(約0.0001%)以下であった。

【0228】B.メチルポリエチレングリコールで変性した[Met⁻¹,Ser^{17,27}]ヒトG-CSFの調製。参考例7と同一の方法を繰返した。最終生成物はタンパク質1モル当り、共有結合したメチルポリエチレングリコール約4.1モル含有していた。[Met⁻¹,Ser^{17,27}]ヒトG-CSFの比生物学的活性(specific biological activ

ity)(1.4×10^5 U/mg) は、変性後、 2.4×10^5 U/mg (17%) にしか低下しなかった。生成物は完全に安定であり、PBS 中で10mg/ml (タンパク質による) までの溶解状態での比活性は37°Cで14日間に亘って変化しなかった。これらの結果は比較例7の場合と厳密に類似しており、所与のアミノ基の配列について得られる結果の一致性を示している。

【0229】参考例4

メチルポリエチレングリコール5000で変性された [Met⁻¹, Arg, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSFの調製。
下記の操作を行ったこと以外、参考例7と同一の方法を繰返した：冷凍細胞ペースト(500g)をポリトロンPT 6000 ホモジナイザーを使用して50mM トリスHCl、25mM EDTA、pH8.0(5 l)中に4°Cに再懸濁させた。懸濁液をマントン-ガウリン(Manton-Gaulin) ホモジナイザーを6000 psi で3回通過させることにより溶菌し(lyse)ついでソルバルRC3C遠心分離器内でH6000Aローターを使用して5000gで30分間、遠心分離した。上澄液を廃棄し、ペレットフラクションを更に精製する前、-20°Cで貯蔵した。

【0230】ペレットフラクション(200~250)を解凍しついで5 mM EDTA 中の1w/v %のデオキシコール酸(ナトリウム塩)、5 mMのジチオトレイトール、1 mg/ml のナトリウムアジドを含有する50mMのトリス HCl, pH9.0 (3 l)中に、PTA20 ブローブを有するポリトロン(Polytron) PT10-35型ホモジナイザーを使用して再懸濁させた。懸濁物を20°Cで30分間混合しついでソルバルRC3C遠心分離器中でH6000Aローターを使用して5000gで30分間遠心分離した。上澄液を廃棄しついでペレットを上記と同じ方法で2回再処理した。次にペレットを水(3 l)に2回、再懸濁させ、5000gで30分間、遠心分離した。洗浄封入体(inclusion body)を含有する最終ペレットを1 mg/mlのナトリウムアジドを含有する50 mM トリスHCl, pH8.0 (300ml) 中の2w/v%N-ラウロイルサルコシンナトリウム塩(サルコシル)中で可溶化した。硫酸第2銅を20μM に添加し、混合物を20°Cで16時間攪拌しついでソルバルRC5C遠心分離器中でSS34ローターを使用して30,000gで遠心分離した。誘導体を含有する上澄液を、更に直ちに精製するか、使用することが必要になるまで-20°Cで貯蔵した。

【0231】可溶化された誘導体を1 mg/mlのナトリウムアジドを含有する50mM トリスHCl, pH 8.0中の2w/v%サルコシル中で15mg/mlのタンパク質含有量(E₂₈₀により評価)に調整しついで5 μMフィルターを通過させて粒状物質を除去した。濾液の80mlのアリコート、1 mg/mlのナトリウムアジドを含有する50mM トリスHCl, pH 8.0中の0.3w/v%N-ラウロイルサルコシン(Na塩)で平衡化した(equilibrate) セファクリル(Sephacryl) S200HRのカラム(10×90cm)に通送した。カラムを同一の緩衝液を用いて2.5ml/分の流率で溶離し、10mlのフラクション

を捕集した。誘導体タンパク質を含有するフラクションを捕集し(約100ml)、4°Cで貯蔵した。数個のカラムから捕集した、誘導体含有フラクションを一緒にし(約1000ml)、SIV10 膜(10kD カットオフ)を取付けたアミコン(Amicon)CH2A-1S ダイアフィルタレーション装置を使用して、1mg/mlのナトリウムアジドを含有する10mM 磷酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム(pH7.4) に対して透析した。残留液(retentate)を、必要に応じて、ソルバルRC5C遠心分離器内で GSAローターを使用して15,000 xgで30分間遠心分離しついで澄清化された残留液をスペクトラボール6-8 kDaカットオフチューブ内で、20mM 酢酸ナトリウム、100mM 塩化ナトリウムに対して、これを3回交換して(残留液300 ml当り、8 l)、pH 5.4、4°Cで24時間透析を行った。形成された沈澱を15,000xgで30分間遠心分離しついで上澄液を水(上澄液300 ml当り8 l)で3回透析した。最終残留液を15,000xgで30分間、遠心分離しついで0.1M 硼酸ナトリウム pH 8.0にせしめた。精製された誘導体を直ちにメチルポリエチレングリコールで変性するか、必要になるまで-20°Cで貯蔵した。

【0232】参考例5

メチルポリエチレングリコール5000で変性されたヒト [Met⁻¹, Ser^{17,27}] G-CSF の調製
下記の操作を行ったこと以外、参考例3のAと同一の方法を繰返した。重複体(duplex)I をT4ポリヌクレオチドキナーゼでホスホリル化しついで1X緩衝液(BCL; 30 μl) 中でMst II(10 単位)を使用して37°Cで2時間切断した。エタノールで沈澱させた後、143bp EcoRI-Mst II断片を7 Mの尿素を含有する10%ポリアクリルアミドゲル上で精製し、電気溶離(electroelution)によりゲルスライスから単離しついでDNA鎖を参考例1で述べた方法でアンニールした。

【0233】上記した合成RcoRI-Mst II断片を参考例1に記載されるプラスミドベクターpAG88 中にクローンした。ベクターを調製するためには、pAG88(10μg)を1 XH緩衝液(BCL; 100μl) 中でMst II (2 単位, BCL) を使用して37°Cで2時間切断した。DNA をエタノールを使用して0.3M酢酸ナトリウムから-20°Cで沈澱させついで1XH緩衝液(BCL; 100μl)中でEco.RI(20 単位; BCL) を使用して37°Cで2時間切断した。エタノールを使用して沈澱させた後、大きなRcoRI-Mst II切断を1%アガロースゲル上で、ジェネクリーン(商標)を使用して、製造業者(Bio 101 USA)の指示に従って精製した。143bp 断片の大きなRcoRI-Mst断片への連結は参考例1 (b) に述べた方法で行った。合成断片を含有するコロニーをオリゴヌクレオチド(SEQ ID No24) から調製した放射性プローブを使用するスクリーニングにより確認し、正しい塩基配列は参考例1に述べるDNA 塩基配列決定法により確認した。[Met⁻¹, Ser^{17,27}] G-CSF についての遺伝子含有するプラスミドをpICI11107 と命名した。この遺伝子

を発現ベクターpICI0020中にクローンしついで参考例と同様の方法で精製を行った。

【0234】参考例6

Taylor, J W et al Nucleic Acids Research (1985) Vol pp 8749-8764
Taylor, J W et al Nucleic Acids Research (1985) Vol pp 8765-8785
Nakamaye, K et al Nucleic Acids Research (1986) Vol pp 9679-9698
Sayers, J R et al Nucleic Acids Research (1988) Vol pp 791-802

【0235】この方法はAmersham Internationalによって提供されるキットを使用して行い得る。この方法は以下に概略述べられておりそして2種以上の突然変異誘発オリゴヌクレオチドを使用すること及び長さが30塩基よ※

1. 突然変異体オリゴヌクレオチドの一重鎖DNA 鋳型へのアニーリング:

一重鎖DNA 鋳型 (1 μ g/ μ l)	5 μ l
燐酸化突然変異誘発オリゴヌクレオチド (1.6pmol/ μ l)	2.5 μ l
緩衝液 I	3.5 μ l
水	6 μ l

(2種の突然変異誘発オリゴヌクレオチドを同時に使用した場合、各々の燐酸化オリゴヌクレオチド (1.6pmol/1 μ l) 2.5 μ l を、3.5 μ l の緩衝液 I 及び 3.5 μ l の水中の5 μ l の一重鎖DNA 鋳型 (1 μ g/ μ l) に添加した。3種の突然変異誘発オリゴヌクレオチドを使用した場合、各々の燐酸化オリゴヌクレオチド (1.6pmol/1 μ l) 2.5 μ l を、5 μ l の一重鎖DNA (3.5 μ l の緩衝液 I 及び1 μ l の水中の溶液 1 μ g/ μ l) に添加した。) 上記成 ★

MgCl ₂ 溶液	5 μ l
ヌクレオチド混合物 I (dCTP アルファ- ³² S 含有)	19 μ l
水	6 μ l
クレナウ (Klenow)断片 (6単位)	1.5 μ l
T4DNA リガーゼ	2 μ l

上記成分を16°Cの水浴中に装入し、一夜放置した。

【0238】3. 使い捨て遠心分離フィルター装置を使用する。一重鎖 (非突然変異体) (non-mutant) DNA の除去。

工程2からの反応溶液に水170 μ l 及び5 M NaCl 30 μ l を添加した。250 μ l の試料を前記フィルター装置の上部の半分に添加し、ソルバルRT6000B ベンチトップ (bench top) 遠心分離器内でソルバルH1000Bスイングアウト☆

3 M酢酸ナトリウム (pH6.0)	28 μ l
冷エタノール (-20°C)	700 μ l

【0241】混合物をドライアイス-エタノール浴中に20分装入しついでエッペンドルフマイクロフュージ (Eppendorf microfuge) 中で遠心分離した。ついでベレットを10 μ l の緩衝液2に再懸濁させた。

【0242】4. Nci I を使用する非突然変異体DNA 鎖のニッキング。 ◆

500mM NaCl	12 μ l
緩衝液 4	10 μ l
エキソヌクレアーゼ III (50単位)	2 μ l

【0244】混合物を37°Cの水浴中に装入し、37°Cで30分間インキュベートした (50 単位のエキソヌクレアーゼ

* 特定部位の突然変異誘発によるヒトG-CSF の誘導体の遺伝子の調製Eckstein及び共同研究者によるホスホロチオ

* エート法を使用した:

Taylor, J W et al Nucleic Acids Research (1985) Vol pp 8749-8764
Taylor, J W et al Nucleic Acids Research (1985) Vol pp 8765-8785
Nakamaye, K et al Nucleic Acids Research (1986) Vol pp 9679-9698
Sayers, J R et al Nucleic Acids Research (1988) Vol pp 791-802

※り大きいオリゴヌクレオチドについてのインキュベーション温度を使用するという点で原法と異なる。

【0236】

★分をキャップ付チューブに装入し、オリゴヌクレオチドが30塩基以下の長さである場合には、70°Cの水浴中に3時間、また、オリゴヌクレオチドが30塩基以上の長さの場合には、沸騰水浴中に3分間、放置した。ついでチューブを37°Cの水浴中に30分、放置した。

【0237】2. 突然変異体DNA 鎖 (mutant DNA strand) の合成と連結

アニーリング反応溶液に下記の成分を添加した:

30 ☆ローターを使用して、室温で10分間、1500rpm で遠心分離した。試料相を2枚のニトロセルロース膜を通過させ、これによって、単一重鎖DNA を結合させ、二重鎖DNA を以下に述べる捕集チューブに通送した。

【0239】100 μ l の50mM NaCl を添加してから、再び10分間回転させて、残留RF DNAを完全に洗浄した。

【0240】下記の成分を濾液に添加した:

40 ◆工程3からの反応混合物に65 μ l の緩衝液3及び8単位のNci I (1 μ l) を添加した。混合物を37°Cの水浴中に90分間、放置した。

【0243】5. エキソヌクレアーゼ III を使用する非突然変異体DNA 鎖の切断。

工程4からの反応混合物に、下記の成分を添加した:

500mM NaCl	12 μ l
緩衝液 4	10 μ l
エキソヌクレアーゼ III (50単位)	2 μ l

III は30分間で約3000塩基を切断するであろう)。ついで混合物を70°Cの水浴中に15分間装入して酵素を不活性

化した。

【0245】6. ギャップト(gapped)DNA の再重合及び*

ヌクレオチド混合物2

MgCl₂ 溶液

DNA ポリメラーゼI(4単位)

T4 DNA リガーゼ(2.5単位)

を添加した。混合物を16°Cの浴中に3時間、放置した。

【0246】7. 上記DNA を使用するコンピテント宿主 E.coli TG1 細胞の形質転換。

300 μl の調製直後のコンピテント E.coli TG1細胞(Mandel 及びHigaの方法に従って調製)を工程6からの反応混合物20μl を用いて形質転換した(二回)(in duplicate)。形質転換体をTYプレート上のTYトップアガー中のログフェーズ(log phase)TG1のローン(lawn)上に載せ、37°Cで一晩インキュベートした。

【0247】E.coli菌株TG1は米国、エール大学、E. coli Genetic Stock Centre及び英国、Buckinghamshire HP7, 9NA, Amersham, Little Chalfont, Amersham place, Amersham International plcから、“試験管内”突然変異誘発システム、オリゴヌクレオチドダイレクテッドキッド(Oligonucleotide directed kit) (製品コードPR N1523)として自由に入手し得る。

【0248】参考例7

メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

A. ヒト[Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

参考例3又は5で述べた[Met⁻¹, Ser^{17,27}] G-CSF についての遺伝子を含有する突然変異鋳型(mutagenic template)を使用して、参考例6に記載した方法を繰返した。使用した突然変異誘発オリゴヌクレオチドは指定の(designed)SEQ ID No28 及びSEQ ID 29 であり、後に定義されている。

【0249】SEQ ID No 28中のトリプレットACG は11位のGln をArg に転化する作用を行い、SEQ ID No29 中の最初と最後のAGA トリプレットは65及び60位のPro をSer に転化する作用を行う。突然変異誘発(mutagenesis)は単一プライミング突然変異誘発(single priming mutagenesis)においてSEQ ID No29 を使用して参考例6で述べる方法で行った。これによってPro 60 Ser及びPro 65 ser変異(change)を包含する単一ブラークが得られた。このブラークから比較例6に述べた方法に従って一重鎖DNA を調製した。このDNA を、SEQ ID No28 を突然変異プライマー(mutagenic primer)として使用する単一プライミング突然変異誘発における突然変異鋳型として使用した。これによって100 以上のブラークが得られ、その中の3個を前記したときDNA 塩基配列決定法によりスクリーンした。3個のブラークの全てが組込まれた変異(change)の完全なセットを有していた。二重鎖RF DNAをブラークの一つから、一重鎖DNA を大量に製造する方法

* 連結

工程5からの反応混合物に

13μl

5μl

1μl

1μl

(実施例1の工程d~工程B5)に従って調製した。RF DNAをBirnboim及びDolyのアルカリ溶菌法(“Nucleic Acid Research” (1979), 7, 1513~1523)によりバクテリアベレットから抽出しついでSambrook, Fritsch 及びManiatisにより“MolecularCloning a Laboratory Manual” (Cold Spring Harbor Publication)に記載される塩化セシウム密度勾配遠心分離により精製した。精製したRF DNAを前記したとき緩衝液H中でEcoRI とSal Iを使用して切断しついでtrp プロモーター、リボソーム結合部位、翻訳開始コドン及び[Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27}] G-CSF についての遺伝子を有する619bp 断片を0.7 %アガロースゲルからジェネクリーン(商標)を使用して単離した。断片を、前記した方法と実質的に同一の方法に従って、2:1 より過剰のインサート:ベクターのモル比を使用してかつT4DNA リガーゼ(BRL) とリガーゼ緩衝液(ligase buffer) を使用して、EcoRI-SalI切断pIC10020ベクター中に連結した。連結混合物を使用して、E.coli菌株HB101 を形質転換した。形質転換細胞を50μg/mlのアンピシリンを含有するL-アガープレート上での生長により選択した。“Molecular Cloning-a Laboratory Manual”, Sambrook, Fritsch及びManiatis (Cold Spring Harbor Publication)に記載のBirnboim及びDolyの方法により調製されたプラスミドDNA の制限分析により、コロニーを挿入DNA の存在についてスクリーンした。所期の619bp EcoRI-SalIインサートを含有するコロニーからのプラスミドDNA を使用して、E.coli菌株MSD522と指定の(designed)pIC1239とを形質転換した。発酵と精製は実施例3と同様の方法で行った。

【0250】B. メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

水(400ml) 中の[Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の溶液を、0.8M硼酸ナトリウムpH 8.8を添加することによりpHを8.0に上昇させついでアミコンYM10膜(MW カットオフ10kDa)上での限外濾過により50ml(8mg/l)に濃縮した。この溶液に等容量の0.8M硼酸ナトリウム、pH8.8 を添加しついでMW= 約5000のメチルポリエチレングリコール(Sigma Chemicals)(11.3g, 100等量; [Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF 上のアミノ基1個当り、20等量) を水(100ml) に溶解して添加した。穏やかに攪拌しながら室温で3時間反応を行いついでエタノールアミン塩酸塩pH8.0(活性化メチルポリエチレングリコール1モル当り10等量) を添加することにより反応を停止した。反応混合物をアミコンYM30膜(MW カット

オフ 30kDa)上で 4℃で濃縮して、最終残留液容量を 50ml とした。残留液を 1.0M 炭酸水素ナトリウム、pH 8.0 (200mM) で稀釈しついで限外濾過により前記したごとく 50ml に再濃縮した。この操作を 4 回繰返しそして生成物を最終的に約 25ml に濃縮した。生成物の濃縮溶液を 10mM 磷酸ナトリウム、1mg/ml のナトリウムアジド (PBS-アジド) を含有する 150mM 塩化ナトリウム pH 7.4 で平衡化したウルトロゲル AcA54 のカラム (5×90cm) 上でのクロマトグラフィーにかけた。タンパク質を含有するフラクションを、沃素/沃化カリウム滴定 (CR Acad. Sci. Paris 27 4, 1617, 1972) により 280 nm におけるタンパク質とメチルポリエチレングリコールを監視することによって同定し、ブールしついで水に対して徹底的に透析した。最終生成物をアミコン YM30 膜上での限外濾過により 11.5mg/ml 以上まで濃縮し、無菌状態で 0.22μm フィルターを通して濾過しそして後に使用するために 4℃で貯蔵した。

【0251】酸加水分解後のアミノ酸分析によるタンパク質の評価の結果は、最終変性生成物中に [Met¹, Arg¹, Ser^{17, 27, 60, 65}] ヒト G-CSF の 51% が全体として回収されていることを示した。反応混合物についての PAGE-SDS は未反応の [Met¹, Arg¹, Ser^{17, 27, 60, 65}] ヒト G-CSF が残留していないことを示した；全ての生成物は高い MW ストリーク (high MW streak) として行動する。沃素/沃化カリウム滴定による濾液と残留液の分析結果は、YM30 膜上で pH 8.0 で透析濾過を反復することにより、タンパク質非結合メチルポリエチレングリコールの全てが効果的に除去されることを示した。このことをウルトロゲル AcA54 のカラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーを行いついでブランクエタノールアミン反応停止 (blank ethanol amine quenched) 活性化メチルポリエチレングリコールで検量 (calibrate) を行うことにより確認した。メチルポリエチレングリコールに共有結合した [Met¹, Arg¹, Ser^{17, 27, 60, 65}] ヒト G-CSF の沃素/沃化カリウム滴定と、酸加水分解後のアミノ酸分析によるタンパク質の評価とを組合せて行った結果は、タンパク質 1 モル当り、約 3.9 モルのメチルポリエチレングリコールが結合していることを示した。[Met¹, Arg¹, Ser^{17, 27, 60, 65}] ヒト G-CSF の比生物学的活性 (1.2×10⁹ U/mg) はメチルポリエチレングリコールによる変性後、2.2×10⁸ U/mg (19%) に低下していた。この生成物は完全に安定であり、10mg/ml (タンパク質による) までにおいて、PBS 中に溶解した状態で、37℃で 14 日間に亘って比活性に変化は認められなかった。

【0252】参考例 8

メチルポリエチレングリコールで変性した [Met¹, Glu¹³, Ser^{17, 27}, Ala^{26, 28}, Lys³⁰] ヒト G-CSF の調製。
A. [Met¹, Glu¹³, Ser^{17, 27}, Ala^{26, 28}, Lys³⁰] ヒト G-CSF の調製。
参考例 3 又は 5 で述べた [Met¹, Ser^{17, 27}] G-CSF につ

て参考例 7 の方法を繰返した。使用した突然変異誘発オリゴヌクレオチドは SEQ ID No33 及び SEQ ID No34 であり後に定義されている。

【0253】SEQ ID No33 中のトリプレット TTC は 15 位の Leu を Glu に転化する作用を行う。SEQ ID No34 においては、最初の TTT トリプレットは 30 位の Ala を Lys に転化する作用を行い、トリプレット AGC は 28 及び 26 位の Gly を Ala に転化する作用を行う。

【0254】突然変異誘発操作は二重ブライミグ実験として参考例 6 で述べたものと実質的に同一であり、発現カセットを発現プラスミドに転移させて pICI 1266 を得た。

【0255】b) 精製

冷凍細胞ペーストを溶解し、粗ベレットフラクションを参考例 3 に記載の方法で分離した。このタンパク質を含有するベレット中の封入体を参考例 3 に記載の方法でデオキシコール酸 (Na 塩) 緩衝液により可溶化した。このタンパク質を下記の方法で変性した。

B. メチルポリエチレングリコール 5000 で変性された [Met¹, Glu¹³, Ser^{17, 27}, Ala^{26, 28}, Lys³⁰] ヒト G-CSF の調製。

この化合物は 30 位に追加の Lys 残基を有するが、同様に 100 モル等量の反応剤を使用して参考例 7 に記載の方法で調製した。最終生成物はタンパク質 1 モル当り、共有結合したメチルポリエチレングリコールを約 4.7 モル含有していた。この結合量の増加は変性のための潜在的部位が余剰に存在することと一致し、PAGE-SDS において MW が若干増大することに反映されている。未変性誘導体の比生物学的活性、1.2×10⁹ U/mg は変性生成物においては 4.4×10⁷ U/mg (3%) に低下している。この生成物は完全に安定であり、PBS 中で 10mg/ml (タンパク質による) までの溶解状態において、37℃で 14 日間、比活性に変化は認められなかった。

【0256】参考例 9

発酵工程 (例えば参考例 3 (e) 参照) において E. coli 菌株 MSD522 の代りに、E. coli TG 1 を使用して、参考例 1, 3 及び 5 の方法を繰返した。

【0257】参考例 10

ヒト [Met¹, Arg¹, Ser^{17, 27, 60, 65}] G-CSF の別の抽出法。

冷凍細胞ペースト (640g) を 1mg/ml のナトリウムアジドを含有する 50mM トリス HCl, 5mM EDTA, 5mM ジチオトレイトール及び 2M 尿素からなる緩衝液 (pH 8.0) (5 l) 中に、PTA20 ブローブを備えたポリロンホモジナイザーを使用して設定速度 7/8 で 4℃で懸濁させた。懸濁物をマントン-ガウリンラブ (Manton-Gaulin Lab) 60/60 ホモジナイザーを 6000 psi で 3 回通過させることにより溶菌しついで更に 1 l の追加の緩衝液でフラッシュした。-20℃のシングルパスコネイルチラー (single pass Conair chiller) により冷却した。溶菌液 (lysate) を

ソルバルRC3C遠心分離器中で5000xgでH6000Aローターを使用して30分間遠心分離した。

【0258】上澄液を廃棄しついでベレット(約450g)を上記と同一の緩衝液(10l)に再懸濁させた。懸濁液を室温で30分間混合した後、2基のソルバルRC3C遠心分離器中でH6000Aローターを使用して5000 rpmで30分間遠心分離した。上澄液を廃棄し、ベレットを上記と同一の方法で2回処理した。ベレットを2回、水(10l)に再懸濁しついで5000 rpmで30分間遠心分離した。洗浄封入体を含む最終ベレットを1mq/mlのナトリウムアジドを含む50mMトリスHCl, pH8.0(1l)中の2w/v%のN-ラウロイルサルコシンNa塩中にポリロンホモジナイザーを使用して設定速度7で再懸濁させた。水(1.5ml)中の20mMの硫酸第2銅を添加した後、混合物を室温で一晩攪拌しついでソルバルRC3C遠心分離器中でGSAローターを使用して10,000 rpmで30分間遠心分離した。

【0259】誘導体を含む上澄液を5μmフィルターを通して濾過して粒状物質を除去し、1mq/mlのナトリウムアジドを含む50mMトリスHCl, pH8.0(4℃)で6倍に希釈しついでS10Y10カートリッジ(10kDaカットオフ)を取付けたアミコン(Amicon)DC20限外濾過装置内で、1mq/mlのナトリウムアジドを含む10mM磷酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウムからなる溶液pH7.4(90l)に対して最大圧力で限外濾過した(diafilter)。限外濾過の終了が近づくにつれて沈澱が生成した。

【0260】滞留物(2.1mq/mlの全タンパク質、1.7mq/mlの生成物)を容量4lのネジブタ(screw top)付ポリプロピレン容器内に捕集し、37℃で一晩インキュベートした。生成した沈澱をソルバルRC3C遠心分離器内で5000 rpmで45分間遠心分離することにより除去し、上澄液を4℃で貯蔵した。

【0261】SDS-PAGE及びrpHPLCにより監視した結果から、最終の熱処理中に、混入E.coliタンパク質、生成物オリゴマー及び分解生成物が選択的に沈澱し、所望の生成物の約85%が溶解していることが認められた。高度に富化された、清澄化された熱処理生成物溶液は十分に生物学的に活性であり、20mq/mlの濃度において37℃で2週間に亘って安定であり、かつタンパク質加水分解の生起している証拠は認められず、沈澱の生成は20%以下であった。この生成物は更にクロマトグラフィー精製を行うためのすぐれた中間体である。

【0262】参考例11

*

KH₂ PO₄
Na₂ HPO₄
NaCl
カゼイン加水分解物 (Oxoid L41)
(NH₄)₂ SO₄

* trp プロモーターを含む生産ベクターを使用する[Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSFの調製。

a) プラスミドpICI1239(参考例7に記載)を前記したとき方法で緩衝液H中でEcoRI-Sal Iにより切断した。trp プロモーター、リボソーム結合部位及び[Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFについての遺伝子を含む小さいRcoRI-Sal I断片をジェネクリン(商標)を使用して0.7%アガロースゲルから単離した。pICI 0080(比較例6参照)から緩衝液H中でEcoRI及びXho Iで切断することによりベクター断片を調製しついで大きなEcoRI-Xho I断片をジェネクリンを使用して0.7%アガロースゲルから単離した。小EcoRI-Sal I断片を前記したごとく2:1よりモル過剰のインサート:ベクターのモル比を使用してEcoRI-Xho Iベクター断片に連結しついで連結混合物を使用してE.coli菌株MSD522を形質転換した。テトラサイクリン(15μg/ml)を含むL-アガープレート上で生長させるための形質転換細胞(transformant)を選択した。3個のコロニーを選択し、補充剤(supplement)とテトラサイクリン(15μg/ml)を含むM9最小培地(75ml)中で37℃で20時間往復振盪器上で生長させた。全細胞溶解物のクーマシーブル染色SDS-PAGEゲルを走査することにより、タンパク質の蓄積(protein accumulation)を測定した。3個のコロニーの全てが[Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFを発現した。これらのコロニーの一つからのプラスミドDNAは指定されたpICI1327であり、プロモーターと遺伝子の配列を前記した標準チェインターミネーター法により確認した。

【0263】b) 発酵
pICI1327をE.coli菌株MSD522に形質転換させ、得られた組換え体を精製し、グリセリンストック上に-80℃で保持した。培養株のアリコートをストックから取り出し、テトラサイクリンのアガープレート上でストリークして、37℃で一晩生長させた後、単一コロニーを分離した。単一の所望のコロニーを取り出しついで10mlのテトラサイクリンブロスに再懸濁させついで直ちに100μlを75mlのテトラサイクリンブロスを含む容量250mlの3個のエrlenmeyerフラスコの各々に接種した。37℃で16時間往復振盪器上で生成させた後、フラスコの内容物をブールし、20L増殖培地を含む発酵器に接種するのに使用した。

増殖培地の組成

蒸留水を用いて調製

	g/l
KH ₂ PO ₄	3.0
Na ₂ HPO ₄	6.0
NaCl	0.5
カゼイン加水分解物 (Oxoid L41)	2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	10.00

87	
酵母エキス (Difco)	10.00
グリセリン	35.00
L-ロイシン	0.625
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.03
チアミン	0.008
FeSO ₄ / クエン酸	0.04/0.02
微量元素溶液 (TES)	0.5 ml l ⁻¹
テトラサイクリン	10 mg l ⁻¹

88

ついで発酵を37°Cの温度でかつ6M水酸化ナトリウム溶液を自動的に添加することによって制御されている。6.7のpHで行った。溶解酸素張力 (dissolved oxygen tension) (dOT) の設定点は50%空気飽和率 (air saturation) であり、発酵器の攪拌速度を自動調節することにより当初に制御した。1分当り、容量当り、1容量 (VVM) に相当する発酵器への空気流率を当初の20 l / 分から、発酵器攪拌速度がその最大値の80~90%に到達したとき、50 l / 分 (2.5VVM) に増大させた。発酵器の酸素移行速度 (oxygen transfer rate) (OTR) は、記載される条件下で50のOD₅₅₀に相当する細胞濃度 (cell density) より大きい細胞濃度においては、バクテリアの酸素吸収速度 (oxygen uptake rate) (OUR) を満足させることができないので、この細胞濃度より大きい細胞濃度における発酵器内のdOTは、バクテリアの酸素吸収速度を制限することにより、50%の空気飽和率に保持した。これは培地を炭素が50のOD₅₅₀に制限されるように調製しついで制限炭素源 (limiting carbon source) の栄養 (feed) を硫酸アンモニウム及び酵母エキスと共に、バクテリアの生長を制限する速度で供給することにより達成した。

【0264】発酵は18時間行い、この間に光学密度 (OD₅₅₀)、細胞の乾燥重量及び細胞内の [Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSFの蓄積を測定するためのサンプル採取した。[Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSFの蓄積は、当業者に周知のごとく、試料バクテリアの全細胞溶解物 (lysate) のクーマシーブルー染色 SDS-PAGEゲルを走査することにより測定した。OD₅₅₀が35に到達したとき (8.5時間)、カゼイン加水分解物溶液 (100g / l のOxozoid L41) を0.75g / l / 時の割合で発酵器に注入した。

【0265】OD₅₅₀が約50に到達したとき、発酵バック中の炭素源の供給物が消費され、dOTが50%空気飽和率から急速に上昇した。この時点で、グリセリン (470g / l)、酵母エキス (118g / l) 及び硫酸アンモニウム (118g / l) を含有する栄養を、元の速度で発酵器に供給しついで発酵器を最大値の約70~80%で攪拌しながら、dOTを50%空気飽和率に保持した。カゼイン加水分解物供給率は全体を通じて0.75g / l / 時に保持した。約18時間後、培養液の顕微鏡検査により大部分の細胞内に大きな封入体 (inclusion body) の存在が認められたとき、バクテリアをソルバル (Sorval) RC3B遠心分離器上で捕集し (7000g、

30分、4°C)、-80°Cで冷凍して保存した。

【0266】c) 精製

精製は参考例3(f)に記載したとき方法で行った。

【0267】参考例12

TA3プロモーターを含有する生産ベクターを使用する [Met⁻¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSFの調製。

a) T7A3プロモーター、trpリーダリボソーム結合部位配列及び [Met⁻¹, Ser^{17,27}] hu G-CSFについての遺伝子を含有するEcoRI-SalI断片を、参考例3のd)で述べたごとくM13mp18中にサブクローンした。EcoRI-SalI断片の塩基配列はSEQ ID No47及び図4及び図5に記載されており、SEQ ID No47はEcoRI制限部位 (ヌクレオチド1~6)、バクテリオファージT7のA3プロモーター配列 (ヌクレオチド7~52)、trpリーダリボソーム結合部位配列 (ヌクレオチド53~78) 及び翻訳開始コドン、(ヌクレオチド79~81) からなる。図4及び図5にはSalI制限部位で終結する [Met⁻¹, Ser^{17,27}] ヒトG-CSFのヌクレオチド配列が記載されている。SEQ ID No47の3'末端ATGコドンは、図4及び図5においてスレオニン (アミノ酸1) をコードするACTコドンの直前にあることは理解されるであろう。従って5'ヌクレオチド配列AATTCAGTはEcoRI-SalI断片から欠けている。EcoRI-SalI断片はpIC1295から切り出し (excision) によっても調製し得る (参考例31参照)。特定部位の突然変異誘発

(site-directed mutagenesis) を、オリゴヌクレオチドSEQ ID No 28を使用して参考例6に記載されるごとく一重鎖DNAについて行って、11位のGlnをArgに転化した。二重鎖RF DNAは、Gln¹¹ → Arg¹¹変異を含有するブラックから、工程B3においてインキュベーションを5時間の代りに3時間行ったこと以外、参考例7に記載と同一の方法で調製しついでRcoRI (前記したもの) 及びSnaBI (参考例13に記載) で切断した。かく得られた、T7A3プロモーター、trpリーダリボソーム結合部位配列及びArg¹コドンを有する遺伝子断片を含有する144bp EcoRI-SnaBI断片を単離しついでpIC1327からのEcoRI-SnaBI切断ベクター (これはSer⁶⁰及びSer⁶⁵についてのコドンを含有しており、参考例11に記載されている) に連結した。連結混合物を使用してE. Coli菌株MSD522及びテトラサイクリン (15 µg / mg) を含有するL-アガプレート上での生長のために選択された形質転換細胞を形質転換した。所期のT7A3プロモーター及び [Met⁻¹, Arg

¹¹,Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF 遺伝子配列を含有するコロニーからのプラスミドDNAを、単離されたプラスミドと指定のpICI 1386からのDNAの塩基配列決定によって同定した。

【0268】発酵は異なる2種の方法(b)及び(c)に従って行った。方法(b)は37°Cで行い、16時間発酵後においては微生物バイオマス(microbial biomass)は35g/lであり、[Met⁻¹,Arg⁻¹,Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSFは発酵ブロス(fermentationbroth) 1 l 当り7 gまで蓄積されていることが認められた。方法(c)は30°Cで行い、従って、発酵温度が低いため、発酵はより遅かった。方法(c)については、35時間後、微生物バイオマスは55g/lであり、[Met⁻¹,Arg⁻¹,Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSFの収量は発酵ブロス 1 l 当り15 gまで蓄積されていることが認められた。

b) E.coli Genetic Stock Center から入手されたE.co*

表1 増殖培地の組成

変性LCM50 増殖培地(A)

蒸留水を用いて調製		g/l
KH ₂ PO ₄		3.0
Na ₂ HPO ₄		6.0
NaCl		0.5
カゼイン加水分解物 (Oxoid L41)		2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄		10.0
酵母エキス (Difco)		20.0
グリセリン		35.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O		0.03
チアミン		0.008
FeSO ₄ /クエン酸		0.04/0.02
微量元素溶液 (TES)		(0.5ml/l)
テトラサイクリン		(10ml/l)

ついて発酵を37°Cの温度でかつ6M水酸化ナトリウム溶液を自動的に添加することによって制御されている、6.7のpHで行った。溶解酸素張力(dOT)の設定点は50%空気飽和率であり、当初、発酵器の攪拌速度を自動調節することにより制御した。1分当り、容量当り、1容量(WM)に相当する発酵器への空気流率を当初の20l/分から、発酵器攪拌速度がその最大値(1000rpm)に到達したとき、45l/分(2.5WM)に増大させた。発酵は16時間行い、その間に培養液の光学密度(OD₅₅₀)、バイオマス濃度、全微生物タンパク濃度及びバクテリア細胞内の[Met⁻¹,Arg⁻¹,Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSFの蓄積を測定するためのサンプルを採取した。G-CSFの蓄積の測定は当業者に周知のごとく試料バクテリアの全細胞溶解物のクーマシーブルー染色SDS-PAGEゲルを走査することにより行った。全微生物タンパク質はlowryの方法で測定した。接種してから4.5時間後に、酵母エキス(225g/l)を1.7g/l/時の割合で発酵器に注入した。

* 1)菌株CGCS 6300(遺伝子型 F⁻,X⁻,lac⁺)をプラスミドpICI 1386で形質転換した。得られた菌株CGCS6300(pICI 1386)を精製し、グリセリンストック中に-80°Cで保持した。培養株のアリコートをストックから取り出し、37°Cで一夜(16時間)生長後、単一コロニーを単離した。

【0269】CGSC 6300(pICI 1386)の単一コロニーを取出し、10mlのL-テトラサイクリンブロス中に再懸濁させ、その100μlを75mlのL-テトラサイクリンブロスを含む20個の250 mlエルレンマイヤーフラスコの各々に接種した。往復振盪器上で37°Cで16時間生長後、フラスコの内容物をブールし、20 lの変性LCM50 増殖培地を含む発酵器に接種した。増殖培地の組成を表1に示す。

【0270】

【0271】増殖培地中の炭素源(グリセリン)の供給物が消費されたとき、dOTが50%空気飽和率から急速に上昇した。この時点で、グリセリン(714g/l)及び硫酸アンモニウム(143g/l)を含む栄養(feed)を注入した。バクテリア酸素吸収速度(OUR)は、バッチ増殖培地中の炭素源が消費される直前に、発酵器の最大酸素移行速度(OTR)に接近したので、バクテリアのOURを発酵器の最大OTRの約80~90%に制限する速度で栄養を発酵器に注入した。供給速度を手動的に調節して元の値にもどし、dOTを記載された条件下で50%空気飽和率に保持した。

【0272】c) 30°Cで35時間、発酵を行ったこと以外、b)と同一の方法を繰返した。発酵温度を30°Cとしたこと以外、培地及び発酵条件は(b)と同一であった。

【0273】精製は参考例3(f)に記載の方法で行った。

50 【0274】参考例13

A) [Met⁻¹, Ser¹⁷] ヒトG-CSF の調製。

下記の操作を行ったこと以外、[Met⁻¹, Ser^{17,27}] ヒトG-CSF を調製するための参考例5で述べたものと同じの方法を繰返した：

1) 燐酸化するための重復体をオリゴヌクレオチド配列SEQ ID NO24, 25, 3及び4から調製した；オリゴヌクレオチド配列SEQ ID NO 3及び4は、それぞれ、参考例3、4及び5で使用した配列SEQ ID NO 26及び27の代りに使用した。

2) 1) で述べた重復体をT4ポリヌクレチドキナーゼで燐酸化したが、1 mM緩衝液 (BC; 30 μl) 中で37°Cで2時間、SnaBI(10単位) を使用して切断した。

3) エタノールを用いて精製した後、143bpEcoRI-Mst IIフラグメント断片の代りに、72bpEcoRI-SnaBI 断片を精製した。

4) 合成EcoRI-SnaBI 断片を参考例1に記載した方法でプラスミドベクターpAG88 中にクローンしそしてベクターを調製するために、pAG88 を1 mM緩衝液中のMstIIの代りに1 mM緩衝液 (BCL; 100 μl) 中のSnaBI(20単位; BCL)を使用して切断した。

5) エタノールを使用して精製した後、大きなEcoRI-MstII 断片の代りに大きなEcoRI-SnaBI 断片を1%アガロースゲル上で精製した。

6) [Met⁻¹, Ser¹⁷] ヒトG-CSF についての遺伝子を含むするプラスミドをpICI 1105 と命名した。

【0275】B. メチルポリエチレングリコール5000で変性した[Met⁻¹, Ser¹⁷] ヒトG-CSF の調製

水中の[Met⁻¹, Ser¹⁷] ヒトG-CSF の溶液(300mg, 6.25mg/l)を1.1M硼酸ナトリウム, pH 8.9を用いて75mlに希釈して0.4 M硼酸液中のタンパク質の溶液(4 mg/ml)を得た。この溶液にメチルポリエチレングリコール p-ニトロフェニルカーボネート (MW=約5000) (Sigma Chemicals)の水溶液(75ml) (タンパク質1モル当り、100当量; アミノ基1個当り、20当量)を攪拌しながら滴下した。反応混合物を室温で3時間攪拌しついでエタノールアミン塩酸塩、pH8(活性化メチルポリエチレングリコール1モル当り、10当量)を滴下することにより反応を停止した。反応混合物を0.1M炭素水素アンモニウム, pH 8で350 mlに希釈しついで濃縮しついでYM30膜 (MWカットオフ30kDa)を取付けたアミコン攪拌セル中で、黄色が残留しなくなるまで上記溶剤で希釈した。最終濃縮液(25ml)を平衡化されたウルトロゲルACA54 のカラム(5×90cm)上でクロマトグラフィーにかけ、PBS-アジドで溶離した。280nmでのタンパク質とメチルポリエチレングリコールを沃素/沃化カリウム滴定によって監視することにより、変性プロテインを含むするフラクションを同定し、プールしついで水に対して徹底的に透析した。この生成物をアミコンYM30膜 (MWカットオフ 30kDa) 上で濃縮し、無菌状態で0.22 μmフィルターを通して濾過しついで後に使用するため、4°Cで保存した。

【0276】最終変性生成物についてのSDS-PAGEは未反応の[Met⁻¹, Ser¹⁷] ヒトG-CSF が残留していないことを示した；全ての生成物は高分子量ストリークとして行動する。残留液と濾液について沃素/沃化カリウムを使用して行った分析の結果は、YM30膜上でのpH 8.0で限外濾過を反復することにより、タンパク質を結合していないメチルポリエチレングリコールの全てが効果的に除去されることを示した。最終生成物はタンパク質1モル当り、共有結合したメチルポリエチレングリコールを約3.5モル含有していた。未変性誘導体の比活性 0.8×10⁹ U/mgは変性生成物については 0.8×10⁸ U/mg (10%)に低下していた。生成物は完全に安定であり、10mg/ml(タンパク質による)までの溶解状態で、37°Cで14日間、比活性は変化を示さなかった。

【0277】参考例14

メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹, Arg^{11,23}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製
A. [Met⁻¹, Arg^{11,23}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

20 [Met⁻¹, Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF についての遺伝子を含むする突然変異鋳型M13mp18 を、pICI 1080の代りにプラスミドpICI 1239 を使用して参考例3(d)に述べた方法によって調製した。上記の突然変異鋳型と突然変異誘発オリゴヌクレオチドとしての、指定のSEQ ID No 38を使用して、参考例7の方法を繰返した。このオリゴヌクレオチドは23位のLys についてのコドンArgに変換する作用をする。二重鎖RF DNAを所望の変異を含むする一つのファージから調製し、そして参考例15 (後記参照)に記載の方法に従って発現カセットを単離しついでクローンしてpICI 1388 を得た。標題化合物を得るために、更に、参考例3及び4に記載の方法を行った。

【0278】B. メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹, Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

0.1M硼酸ナトリウム, pH8.0 中の[Met⁻¹, Arg^{11,23}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF(300mg)の溶液をアミコンYM10膜 (MWカットオフ10kDa)上での限外濾過により37.5mlに濃縮した。この溶液に等容量の0.8M硼酸ナトリウム(pH 8.8) を添加しついでMW=約5000のメチルポリエチレングリコール p-ニトロフェニルカーボネート(sigma Chemicals社製) ([Met⁻¹, Arg^{11,23}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF 1モル当り100 等量)を水(75ml)に溶解して添加した。穏やかに攪拌しながら20°Cで3時間反応を行いついで1Mエタノールアミン塩酸塩pH8.0(15ml, 活性化メチルポリエチレングリコール1モル当り、10等量)を添加することにより反応を停止した。0.1M炭素水素アンモニウムを添加することにより反応混合物を500 mlに希釈しついでSIY30 膜 (MWカットオフ30kDa)を取付けたアミコンCH2A-IS スパイラルカートリッジシステムを使用

して、黄色 p-ニトロフェノールが残留液 (retentate) 中に認められなくなるまで、101 の同一の緩衝液に対して透析濾過 (diafilter) した。残留液を約 300ml に濃縮しついで YM30 膜 (MW カットオフ 30kDa) を取付けたアミコン 8400 攪拌セル中に装入した。残留液を 50ml に濃縮しついで 0.1M 炭酸水素アンモニウム、pH 8.0 を用いて 300 ml に再希釈した。この操作を 4 回繰返しそして生成物を最後に約 25ml に濃縮した。濃縮物溶液を 1mg/ml のナトリウムアジド (PBS-アジド) を含有する 10mM 磷酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム、pH 7.1 で平衡化したウルト

ロゲル ACA 54 のカラム (5×90cm) 上でクロマトグラフィーにかけた。変性タンパク質を含有するフラクションを、沃素/沃化カリウム滴定 (CR Acad. Sci. Paris 27 4, 1617, 1972) により 280 nm におけるタンパク質とメチルポリエチレングリコールを監視することによって同定し、ブールしついで水に対して徹底的に透析した。最終生成物をアミコン YM30 膜上で限外濾過し、無菌状態で 0.22 μm フィルターを通して濾過しついで後に使用するために 4℃ で貯蔵した。

【0279】最終変性生成物についての SDS-PAGE は未変性の [Met¹, Arg^{11,23}, Ser^{17,27,60,65}] ヒト G-CSF は残留していないことを示した；全ての生成物は高い MW ストリーク (high MW streak) として行動する。沃素/沃化カリウム滴定による濾液と残留液の分析結果は、YM30 膜 (MW カットオフ 30kDa) 上で pH 8.0 で透析濾過を反復することにより、タンパク質非結合メチルポリエチレングリコールの全てが効果的に除去されることを示した。最終生成物はタンパク質 1 モル当り、共有結合したメチルポリエチレングリコールを約 3.5 モル含有していた。非変性誘導体の比活性、 2.5×10^9 U/mg は、変性生成物においては 3.5×10^8 U/mg (14%) に低下していた。この生成物は完全に安定であり、10mg/ml (タンパク質による) までにおいて、溶解した状態で、37℃ で 14 日間に亘って比活性に変化は認められなかった。

【0280】参考例15

メチルポリエチレングリコール 5000 で変性された [Met¹, Glu¹⁵, Ala^{6,28}, Arg⁹] ヒト G-CSF の調製

A) [Met¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Arg⁹] ヒト G-CSF の調製

[Met¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{6,28}, Lys³⁰] ヒト G-CSF についての遺伝子を含有する突然変異鋳型 M13mp18 を、pIC11080 の代りにプラスミド pIC1266 を使用して参考例 3 (d) に述べた方法によって調製した。上記の突然変異誘発鋳型と突然変異誘発オリゴヌクレオチドとしての、指定の SEQ ID No 37 を使用して、参考例 7 に記載の方法を繰返した。このオリゴヌクレオチドは 30 位の Lys についてのコドン Arg に変換する作用を有する。二重鎖 RF DNA を所望の変異を含有する一つのファージから調製した。参考例 11 に記載の方法に従って EcoRI-SalI 発現カセットを単離し、pIC10080 中にクローンして pIC11343 を

得た。標題化合物を得るために、更に参考例 7 の方法を行い、精製は参考例 8 に記載の方法で行った。

B) メチルポリエチレングリコール 5000 で変性された [Met¹, Glu¹⁵, Ala^{6,28}, Ser^{17,27}, Arg⁹] ヒト G-CSF の調製。

この化合物は参考例 14 に記載の方法で調製した。最終生成物は共有結合されたメチルポリエチレングリコールをタンパク質 1 モル当り、約 4 モル含有していた。未変性誘導体の比活性 0.9×10^9 U/mg は変性生成物においては 0.6×10^8 U/mg (7%) に低下していた。生成物は完全に安定であり、10mg/ml (タンパク質による) までの溶解状態において、37℃ で 14 日間、比活性変化を示さなかった。

【0281】参考例16

メチルポリエチレングリコール 5000 で変性された [Met¹, Ser^{17,27,115,116}, Glu¹¹¹] ヒト G-CSF の調製。

参考例 3 又は 5 で述べたとき [Met¹, Ser^{17,27}] G-CSF についての遺伝子を含有する突然変異鋳型 M13mp18 を使用して参考例 7 で述べた方法を繰返した。使用した突然変異誘発オリゴヌクレオチドは、指定の SEQ ID No 30 (後に定義) である。

【0282】トリプレット GCT は 116 位の Thr を Ser に転化する作用を行い、トリプレット AGA は 115 位の Thr を Ser に転化する作用を行いそしてトリプレット TTC は 111 位の Ala を Glu に転化する作用を行う。突然変異誘発法 (mutagenesis) は参考例 7 に述べたものと実質的と同一であり、発現カセットを発現プラスミドに転移させて (transfer) pIC1243 を得た。発酵と精製は参考例 3 及び 4 に述べたものと同一の方法で行った。

【0283】B) メチルポリエチレングリコール 5000 で変性された [Met¹, Ser^{17,27,115,116}, Glu¹¹¹] ヒト G-CSF の調製

この化合物は参考例 14 に記載の方法で調製した。最終生成物は共有結合されたメチルポリエチレングリコールをタンパク質 1 モル当り、約 4 モル含有していた。未変性誘導体の比活性 0.7×10^9 U/mg は変性化合物においては 0.8×10^8 U/mg (11%) に低下していた。この化合物は完全に安定であり、10mg/ml (タンパク質による) までの溶解状態において、37℃ で 14 日間、比活性は変化を示さなかった。

【0284】参考例17

メチルポリエチレングリコール 5000 で変性された [Met¹, Arg^{11,165}, Ser^{17,27}, Lys³⁰] ヒト G-CSF の調製。

A) [Met¹, Arg¹¹, Ser^{17,27}, Lys³⁰, Arg⁶⁵] ヒト G-CSF の調製。

参考例 3 又は 5 で述べたとき [Met¹, Ser^{17,27}] ヒト G-CSF についての遺伝子を含有する突然変異誘発鋳型 M13mp18 を使用して参考例 7 で述べた方法を繰返した。使用した突然変異誘発オリゴヌクレオチドは指定の SEQ ID No 28, SEQ ID No 31 及び SEQ ID No 32 (後に定義) で

ある。

【0285】SEQ ID No.31中のトリプレットTTT は58位のTrp をLys に転化する作用を行いそしてSEQ ID No 32においては第2のGCG トリプレットは165 位のTyr を Argに転化する作用を行う。

【0286】突然変異誘発操作は、当初、参考例6で述べたとき突然変異誘発オリゴヌクレオチドとしてSEQ ID No 31及びSEQ ID No 32を使用して二重プライミング実験(double priming experiment)として行った。これによって2個のブランクが得られ、その両者がSEQ ID No 32変異(Tyr165Arg)を有していたが、SEQ ID No31変異を有していなかった。一重鎖DNA を参考例3で述べたとき方法で3個のブランクの1つから調製した。このDNA を、突然変異誘発プライマーとしてSEQ ID No 28及びSEQ ID No 31を使用する二重プライミング突然変異誘発における突然変異鑄型として使用した。これによって2個のブランクが得られその一つは組込まれる変異の完全なセットを有しており、この発現カセットを発現プラスミドに転移させてpICI 1246 を得た。発酵と精製は参考例3及び4で述べたものと同一の方法で行った。

【0287】B)メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹,Arg^{11,165},Ser^{17,27},Lys⁵⁸] ヒトG-CSF の調製。

この化合物は参考例14に記載の方法で調製した。最終生成物は共有結合されたメチルポリエチレングリコールをタンパク質1モル当り、約4.5モル含有していた。未変性誘導体の比活性0.8×10⁹ U/mgは変性生成物においては0.1×10⁹ U/mg (13%)に低下していた。この化合物は完全に安定であり、10mg/ml(タンパク質による)までの溶解状態において37°Cで14日間、比活性は変化を示さなかった。

【0288】参考例18

メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹,Ser^{17,27},Ala^{44,51,55},Lys^{49,58}] ヒトG-CSF の調製。

A) [Met⁻¹,Ser^{17,27},Ala^{44,51,55},Lys^{49,58}] ヒトG-CSF の調製。

参考例3又は5に記載したとき[Met⁻¹,Ser^{17,27}] G-CSF についての遺伝子を含有する突然変異鑄型M13mp18を使用して実施例3に述べた方法を繰返した。使用した突然変異誘発オリゴヌクレオチドは指定のSEQ ID No35及びSEQ ID No36(後に定義)である。

【0289】SEQ ID No.35においては、トリプレットAGC は51位のGly をAla に、また、44位のPro をAla に転化する作用を行い、トリプレットTTT は49位のLeu をLysに転化する作用をする。SEQ ID No 36においては、トリプレットTTT は58位のTrp をLys に転化する作用を行い、第2のAGC トリプレットは55位のGly をAlaに転化する作用を行う。

【0290】突然変異誘発は参考例6で述べたとき二

重プライミング実験として行った。これによって16個のブランクが得られた。8個のブランクは参考例7で述べたときDNA 塩基配列決定によりスクリーンした。全てのブランクがSEQ ID No 36変異(Gyl55 Ala, Trp58 Lys)を有していたが、いずれもSEQ ID No.35変異を有していなかった。参考例3(d)に記載の方法に従ってこれらのブランクの一から一重鎖DNA を調製し、突然変異誘発プライマーとしてSEQ ID No 35を使用する単一プライミング突然変異誘発における突然変異鑄型として使用した。これによって50個のブランクが得られ、その中の3個をDNA 塩基配列決定によりスクリーンし、2個は変異の完全なセットを有していた。発現カセットを発現プラスミドに転移させてpICI1297 を得た。発酵と精製は実施例参考例3及び4に記載の方法で行った。

【0291】B)メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹,Ser^{17,27},Ala^{44,51,55},Lys^{49,58}] ヒトG-CSF の調製。

この化合物は参考例14に記載の方法で調製した。最終生成物は共有結合されたメチルポリエチレングリコールをタンパク質1モル当り、約3.5モル含有していた。未変性誘導体の比活性0.75×10⁹ U/mgは変性生成物においては0.32×10⁹ U/mg (47%)に低下していた。この化合物は完全に安定であり、10mg/ml(タンパク質による)までの溶解状態において37°Cで14日間、比活性は変化を示さなかった。

【0292】参考例19

メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹,Aer^{11,16},Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

A) [Met⁻¹,Arg^{11,16},Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

オリゴヌクレオチドとして、指定のSEQ ID No.38の代りにSEQ ID No.42(これは16位のLys についてのコドン Arg に転化する作用を行う)を使用して参考例14に記載の方法を繰返してpICI 1387 を得た。[Met⁻¹,Arg^{11,16},Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF を得るための他の工程及びこの化合物の精製は参考例3及び4に記載の方法で行った。

【0293】メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met⁻¹,Arg^{11,16},Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

このタンパク質は参考例4に記載される精製法の最終工程で水に対して徹底的に透析したとき、沈澱した。沈澱を0.1M硼酸ナトリウムpH 8.0に溶解しついで参考例14に記載の方法によりメチルポリエチレングリコール5000で変性した。最終生成物は共有結合されたメチルポリエチレングリコールをタンパク質1モル当り、約3.5モル含有していた。未変性誘導体の比活性2.3×10⁹ U/mgは変性生成物においては3.6×10⁹ U/mg (16%)に低下していた。この化合物は完全に安定であり、10mg/ml(タンパク質による)までの溶解状態において37°Cで14日間、

比活性は変化を示さなかった。

【0294】参考例20

メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met¹, Arg^{11,34}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

A) [Met¹, Arg^{11,34}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

オリゴヌクレオチドとして、指定のSEQ ID No.38の代りに、SEQ ID No.39 (これは34位の Lysについてのコドン を Argに転化する作用をする) を使用して参考例14の方法を繰返して、pICI 1389 を得た。標題化合物を得るための他の工程及びこの化合物の精製は参考例3及び4に記載の方法で行った。

【0295】B) メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met¹, Arg^{11,34}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

この化合物は参考例14に記載の方法で調製した。最終生成物は共有結合されたメチルポリエチレングリコールをタンパク質1モル当り、約4モル含有していた。未変性誘導体の比活性 1.4×10^9 U/mgは変性生成物においては 2.0×10^8 U/mg (14%) に低下していた。この化合物は完全に安定であり、10mg/ml (タンパク質による) までの溶解状態において37°Cで14日間、比活性は変化を示さなかった。

【0296】参考例21

A) メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met¹, Arg^{11,40}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

A) [Met¹, Arg^{11,40}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

オリゴヌクレオチドSEQ ID No.38の代りに、SEQ ID No.40 (これは40位のLysについてのコドンをArg に転化する作用を有する) を使用して参考例14の方法を繰返してpICI 1930 を得た。標題化合物を得るための他の工程及びこの化合物の精製は参考例3及び4に記載の方法で行った。

【0297】B) メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met¹, Arg^{11,40}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

この化合物は参考例14に記載の方法で調製した。最終生成物は共有結合されたメチルポリエチレングリコールをタンパク質1モル当り、約4モル含有していた。未変性誘導体の比活性 1.3×10^9 U/mgは変性生成物においては 3.0×10^8 U/mg (32%) に低下していた。この化合物は完全に安定であり、10mg/ml (タンパク質による) までの溶解状態において37°Cで14日間、比活性は変化を示さなかった。

【0298】参考例22

メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met¹, Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

オリゴヌクレオチドSEQ ID No.38の代りにSEQ ID No.41

(これは1, 3, 4及び5位のThr, Leu, Gly及び Proについてのコドンを、それぞれ、Ala, Thr, Try及び Arg に転化する作用を有する) を使用して参考例14の方法を繰返して、pICI1391 を得た。

【0299】この実施例のポリペプチドは本発明の修飾は既知のポリペプチドの溶液安定性を改善するために、G-CSF 活性を有する既知のポリペプチドに適用し得ることを示している。既知のポリペプチドは[Met¹, Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg⁵, Ser¹⁷] huG-CSF であり、これは欧州特許公開第272,703 号公報 (協和醗酵化学工業) に記載されている。標題化合物を得るための他の工程及び標題化合物の精製は参考例3及び4に記載の方法で行った。

【0300】メチルポリエチレングリコール5000で変性された[Met¹, Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

この化合物は参考例14に記載の方法で調製した。最終生成物は共有結合されたメチルポリエチレングリコールをタンパク質1モル当り、約4モル含有していた。未変性誘導体の比活性 1.5×10^9 U/mgは変性生成物においては 2.0×10^8 U/mg (14%) に低下していた。この化合物は完全に安定であり、10mg/ml (タンパク質による) までの溶解状態において37°Cで14日間、比活性は変化を示さなかった。

【0301】参考例23

メチルポリエチレングリコール2000で変性された[Met¹, Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

a) メチルポリエチレングリコール p-ニトロフェニルカーボネート、近似MW2000の調製。

【0302】アセトニトリル(250ml) 中のp-ニトロフェニルクロロホルメート(2.32g, 11.5ミリモル) の溶液に、攪拌しながら0~5°Cでメチルポリエチレングリコール、平均分子量2000 (Sigma Chemicals) (20g, 10ミリモル) を添加しつつトリエチルアミン (1.11g, 1.53ml, 11ミリモル) を滴下した。混合物を室温まで昇温させ、20°Cで24時間攪拌した。沈澱したトリエチルアミン塩酸塩 (0.46g, 理論値1.375g) を濾過により除去し、濾液を1 l ジエチルエーテル (無水) で稀釈した後、0~5°Cで24時間放置した。白色沈澱を濾過により回収しつつ最小容量のエタノールに35~40°Cで溶解しつつ0°Cに冷却することにより再沈澱させた。生成物をアセトニトリル/ジエチルエーテル (1:5 v/v) から再沈澱させて最終生成物を取得し、これをエーテルで洗浄しつつ真空下で乾燥して白色固体15.5g を得た。微量分析の実測値はC, 53.5; H, 9.1; N, 0.4; Cl, 0であり、生成物中にクロロホルメートが存在しないことを示している。

b) メチルポリエチレングリコールで変性された[Met¹, Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

PBS-アジド (300ml, 5mg/ml) 中の[Met¹, Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF (1.5g) の溶液を0.4M硼酸ナ

トリウム、pH 8.8(7×7 l) に対して透析して最終容量 375ml (4 mg/ml) とした。この溶液に、近似MW2000のメチルポリエチレングリコール p-ニトロフェニルカーボネート(10.0g, 60当量, [Met¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF 上のアミノ基 1 個当り 12等量) を攪拌しながら滴下した。穏やかに攪拌しながら室温で3時間反応させついでエタノール塩酸塩、pH 8.0 (活性化メチルポリエチレングリコール 1 モル当り、10 当量) を滴下することにより反応を停止させた。反応混合物をアミコン攪拌セル中のYM10膜 (MWカットオフ 10 kDa) 上で4℃で濃縮して、最終残留液容量を50mlとした。残留液を0.1M炭酸水素アンモニウム、pH 8.0 (450 ml) で稀釈しついで前記と同様の方法で50mlに濃縮した。この操作を7回繰返した。最終濃縮物をYM30膜 (MWカットオフ 30 kDa) を取付けた第2のアミコン攪拌セルに移送し、500 mlに稀釈しついで50mlに再濃縮した。この操作を2回繰返し、生成物を最終容量の50mlに濃縮した。生成物の濃縮溶液を2つの等部分に分けて、PBS-アジドで平衡化したウルトロゲルAcA54 のカラム(5×90cm) 上でクロマトグラフィーにかけた。沃素/沃化カリウム滴定 (C. R. Acad. Sci. Paris. 274, 1617, 1972) により280 nmでのタンパク質とメチルポリエチレングリコールを監視することによって、変性タンパク質を含有するフラクションを同定した。最終水溶液をYM30膜を取付けたアミコン攪拌セル中で50mlの容量に濃縮した。濃縮液を水で500 mlの容量まで稀釈し、再濃縮しついでこの操作を更に5回繰返した。最終濃縮液を無菌状態で0.22ミクロンフィルターを通して濾過し、後に使用するために4℃で保存した。

【0303】酸加水分解後のアミノ酸分析によるタンパク質の評価結果は、全体として、[Met¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の47%が最終変性生成物中に回収されていることを示した。3時間後の反応混合物についてのPAGE-SDS及び最終生成物水溶液についてのPAGE-SDSの結果は未反応タンパク質が存在しないことを示した。濾液及び残留液についての沃素/沃化カリウムを用いる分析結果はYM30膜上での限外濾過を反復することにより、非タンパク質結合メチルポリエチレングリコールの実質的に全てが除去されることを示した。このことをrpC4 (Dynamax 300A, 12μ) 上でのHPLCによるかつ40~90%の濃度勾配のアセトニトリル-水中の0.1 %TFA-, 0.1 %TFA を用いる溶離を行うクロマトグラフィー分析及び単一のピークを与える280nm でのUV吸収の監視を行うことによって確認した。フラクションを凍結乾燥し、水中に再溶解しついで沃素/沃化カリウムを用いる分析による280nm でのタンパク質及びメチルポリエチレングリコールを監視した；フラクションは1 個の一致する (coincident) ピークを示した。タンパク質非結合メチルポリエチレングリコールは、明瞭な、早期に溶離する沃素/沃化カリウム・陽性ピークとして検出されるであ

らう。

【0304】メチルポリエチレングリコール2000に共有結合された[Met¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の沃素/沃化カリウム分析の結果は変動があり、PEG : タンパク比を評価することができない。未変性誘導体の比活性 1.2×10⁹ U/mgは変性生成物においては、1.5×10⁸ U/mg (13%) に低下していた。この化合物は完全に安定であり、10mg/ml (タンパク質による) までの溶解状態において37℃で14日間、比活性は変化を示さなかった。

【0305】参考例24

メチルポリエチレングリコール750 で変性された[Met¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の調製。

a) メチルポリエチレングリコール p-ニトロフェニルカーボネート、近似MW750 の調製。

アセトニトリル (50ml) 中のp-ニトロフェニルクロホルメート (5.1g, 25.3ミリモル) の溶液に0~5℃で攪拌しながら、メチルポリエチレングリコール、平均分子量750(Sigma Chemicals) (20g, 26.67ml) を添加しついでトリエチルアミン (2.69g, 3.71ml, 26.63ミリモル) を30分間に亘って滴下した。反応混合物を室温まで昇温させそして8時間攪拌した。沈澱したトリエチルアンモニウムハイドロクロライドを濾過により反応混合物から除去しついで濾液をジエチルエーテル (無水) (1 l) で稀釈し、4時間で0℃に冷却しついで再び濾過した。全体で3.4gのトリエチルアンモニウムハイドロクロライドを捕集した。濾液を減圧下で蒸発させついで真空中で乾燥させて23.5gの黄色ワックス状固体を得た。微量分析の実測値においてはClは0%であり、これは生成物中にクロルギ酸塩が存在しないことを示している。

【0306】PBS-アジド (50ml) 中の[Met¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF (250mg) の溶液を水及びついで0.4M硼酸ナトリウム、pH8.8に対して透析した。最終溶液 (50ml) に室温で攪拌しながらメチルポリエチレングリコール p-ニトロフェニルカーボネート、近似分子量750 (100当量, [Met¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] G-CSF 上のアミノ基 1 個当り、20当量) の水溶液 (50ml) を滴下した。反応混合物を室温で3時間攪拌しついでエタノールアミン塩酸塩、pH8 (活性化メチルポリエチレングリコール 1 モル当り、10当量) を添加することにより反応を停止した。

【0307】反応混合物をYM10膜 (MWカットオフ10kDa) を取付けたアミコン攪拌セルに移送し、濃縮した。濃縮液 (25ml) を0.1M炭酸水素ナトリウム、pH8 で350ml に稀釈しついで約25mlに濃縮した。この操作を5回繰返した。最終濃縮液 (27ml) を平衡化したウルトロゲルAcA54 のカラム (5×90cm) 上でクロマトグラフィーにかけ、PBS-アジドで溶離した。変性タンパク質を含有するフラクションを、沃素/沃化カリウム滴定により280nmにおけるタンパク質とメチルポリエチレングリコール

を監視することにより同定し、ブールしついで水に対して徹底的に透析した。最終生成物をYMO膜を取付けたアミコン攪拌セル中で濃縮した。最終濃縮液を無菌状態で0.2μmフィルターを通して濾過しついで後に使用するために4℃で保存した。

【0308】酸加水分解後のアミノ酸分析によるタンパク質の評価結果は、全体として、[Met¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の約80%が最終変性生成物中に回収されていることを示した。生成物についてのPAGE-SDSの結果は明瞭なバンドを与え、未反応の[Met¹, Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF が残留していないことを示した。

【0309】沃素/沃化カリウムを用いる濾液と残留液の滴定の結果は、YMO上でpH 8.0で限外濾過を繰返すことにより、非タンパク質結合メチルポリエチレングリコール誘導体の実質的に全てが効果的に除去されることを示した。メチルポリエチレングリコールに共有結合された[Met¹, Arg¹, Ser^{17,27,60,65}] ヒトG-CSF の沃素/沃化カリウム滴定では結果に変動があり、PEG:タンパク質比を評価することはできなかった。未変性誘導体の比活性 1.2×10^9 U/mgは変性生成物においては 4×10^8 U/mg (33%) に低下していた。この化合物は完全に安定であり、10mg/ml (タンパク質による) までの溶解状態において、37℃で14日間、比活性は変化を示さなかった。

【0310】参考例25

メチルポリエチレングリコールで変性する前のG-CSF の特性

参考例1, 3, 7, 8及び13~24の誘導体の水溶液(タンパク質濃度1mg/ml)をアミコンYMO膜上でタンパク質濃度が少なくとも11mg/ml になるまで濃縮した。濃縮中の沈澱を防止するために、原料溶液のpHを、最初、約0.25mMの水酸化ナトリウムを最終濃縮液に添加することにより8.5に調整した。濃縮後、溶液のpHは約8.0に低下した。

【0311】20倍の濃厚磷酸緩衝溶液を添加することにより、濃縮タンパク質溶液を10mg/mlのタンパク質濃度(1.0のA₂₈₀。を与える1mg/ml溶液から評価)に調整した。10mM磷酸ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム、pH 7.4(PBS)中の、この誘導体の10mg/ml溶液を共通原液とし、この溶液を用いてタンパク質の均質性(homogeneity)、同一性、生物学的活性及び溶液安定度を評価した。

【0312】各誘導体について、減圧下及び非減圧下でのPAGE-SDS分析及び逆相HPLCにより、少なくとも95%は一つの成分であることが示された。6N HCl中、110℃での酸加水分解後に繰返して行ったアミノ酸組成分析により、各誘導体についてのアミノ酸及び原液中のタンパク質濃度の正確な測定値が得られた。このタンパク質濃度と、少なくとも6日の異なる日に得られた生物学的定量の

平均値を使用して誘導体の比活性を測定した。選択された誘導体についてのN-末端アミノ酸配列分析(N-terminal sequence analysis)及びエレクトロスプレー質量スペクトル分析(electrospray mass spectrometric analysis)により、所期の配列と分子量が得られた。

【0313】メチルポリエチレングリコールで変性したG-CSF 誘導体(参考例1, 3, 7, 8及び13~24)の原液(stock solution)を同様に調製して、これらの参考例で示したデータを得た。

【0314】参考例26

G-CSF 及びその誘導体の溶液安定度

G-CSF、その誘導体及びメチルポリエチレングリコールで変性したかかる誘導体を磷酸緩衝液(PBS)に4℃で溶解して調製した参考例25に記載される原料溶液を適当に希釈して得られる希釈液を溶液安定度について試験した。タンパク質をPBS中に1mg/ml, 5mg/ml及び、通常、10mg/mlの濃度で溶解した溶液を37℃で14日間、インキュベートした。沈澱の生成について一定の間隔で肉眼で溶液を検査した。14日後に各々の溶液を14,000rpmで20分間遠心分離し、上澄液を傾シャにより除去し、得られたペレットを1重量/容量%のN-ラウロイルサルコシンを含有するPBSに再溶解させた。各々の上澄液及び再溶解した沈澱物中の全蛋白質含量はA₂₈₀。測定法により評価し、未変性G-CSF 及びその誘導体中の単量体含量は逆相HPLCにより評価した。これらの測定値はインキュベーションの開始時の溶液及び4℃で14日間インキュベートした1mg/ml溶液により与えられた対応のデータの百分率として表わした。全蛋白質の評価値と単量体の評価値との間の偏差(variation)は再溶解したペレットの若干においてのみ見出された。かくして、各々の当初の濃度から上澄み液に溶解して残留する蛋白質の割合を決定し得る。

【0315】メチルポリエチレングリコールで変性した後においては、参考例1, 3, 7, 8及び13~24に記載したごとく G-CSF及び全ての誘導体は10mg/mlまでの濃度で完全な溶液安定度を示した。インキュベーション後の各上澄液中の生成物の比活性は原料溶液と同一であり、還元条件下及び非還元条件下でのPAGE-SDSについて差異は認められなかった。

【0316】参考例27

生物学的定量

1) G-CSF の生物学的定量

英国バターン研究所(Paterson Institute)から入手した因子依存性細胞系、バターン(Paterson)-G-CSF(FDCP-G)をG-CSF の存在下に限界希釈法によりクローン化した。クローンE7と呼ばれる G-CSF応答クローンを使用してヒト組換え体G-CSF 活性を測定した。100μlのRPMI 1640 + 10%FCS に入れた 2.5×10^3 FDCP-GクローンE7細胞を、G-CSF を含有する等容量のRPMI 1640 + 10%FCS に添加した。各々のG-CSF 試料は10回の倍加希釈に

よって測定した。96個のウェルを有する微量滴定板の各々のウェル中のRPMI 1640 [Moore GE等のJAMA 199 519 (1967)参照] + 10% FCS (子牛胎児の血清) の最終容量は 200 μ l であった。微量滴定板を調湿インキュベーター中で4日間5%CO₂中で37°Cでインキュベートした。ウェル1個当りに1.0 μ Ciの滴定したチミジンを添加し、最後に6時間に亘ってインキュベートした。細胞をガラス繊維の濾紙上に採取し、放射能の濃度は液体シンチレーション計数によって測定した。滴定したチミジン組込みの濃度は存在するG-CSFの量に正比例することが見出された。FDCP-GクローンE7の検定は蛋白質1mg当り10⁶単位の明示された比活性を有するアメルシャム インターナショナル社 (Amersham International) から入手される組換え体のヒトG-CSFを用いて検量した。

【0317】G-CSF 試料の効力は既知活性の標準品と対比することにより測定された。1ml当りのG-CSF 活性の単位は次式：

[³H-チミジン組込みにおける50%の最高増大を与えるG-CSF 標準品の希釈率 ÷ ³H-チミジン組込みにおける50%の最高増大を与える試料の希釈率] × G-CSF 標準品の単位/ml活性により算出した。

【0318】インターロイキン-2 (IL-2) の生物学的定量

Robb等によりJ. Exp. Med., 160, 1126, 1986に記載されるごとくマウスIL-2依存性細胞系CTLの生長を監視することにより、インターロイキン-2の生理学的活性を評価した。但し上記細胞をIL-2と共に48時間インキュベートした³H-チミジンで6～8時間パルス標識した (pulsed)。

T47D細胞を使用するカルシトニンの生物学的定量

カルシトニンについての生物学的定量法は、ヒト乳癌細胞系T47Dはカルシトニンについての受容器に連結されたアデニル酸シクラーゼを担持しているという原理に基づくものである (Martin等, (1980), Biochem Biophys Res Commun 98: 150-156 参照)。カルシトニンによるT47D細胞の刺激によって、環式AMPの細胞内濃度が増大し、これは放射性免疫検定 (ラジオイムノアッセイ) により定量し得る。未知試料中のカルシトニン又はベグリル化 (PEGylated) カルシトニンの量は、カルシトニン又はベグリル化カルシトニンの、既知の標準試料を使用して作成した標準曲線と比較することによって定量し得る。

【0319】生物学的定量においては、T47D細胞を、血清を含有していない媒体又は燐酸緩衝溶液中の懸濁物として調製した。細胞懸濁物の一部を試験管中に装入し、10⁻⁶M イソブチルメチルキサンチンの存在下、標準カルシトニン又はベグリル化カルシトニンにより、又は、カルシトニン又はベグリル化カルシトニンを含有する試料により20分間、刺激した。細胞懸濁物を沸騰水浴中に5

分間装入することによってインキュベーションを停止させた。0.01%のトリトン (Triton) X-100 の存在下で2サイクルの凍結-解凍を行うことによって細胞を溶解させそして細胞残屑 (cell debris)を10,000xgで5分間遠心分離することにより沈降させた。

【0320】溶解物 (lysate) 上澄液中の環式AMPを市販のキット (kit) (Amersham International, TRK432)を使用して放射性免疫検定法により定量した。標準曲線は環式AMP濃度に対しての、標準カルシトニン又はベグリル化カルシトニンの量をプロットすることによって作成した。未知試料中のカルシトニン又はベグリル化カルシトニンの量は適当な標準曲線からの内挿 (interpolation) により決定した。

【0321】参考例28

メチルポリエチレングリコール5000で変性したヒトカルシトニン (hCT)の調製

凍結乾燥した、化学的に合成した hCTをケンブリッジ リサーチ バイオケミカル (英国、チェシャー) から購入した。逆相及びイオン交換HPLCは単一のピークを示した。hCT上のアミノ基1個当り、5当量のメチルポリエチレングリコールを使用したこと以外、参考例3に記載したものと同一の方法で、75ml H₂O中の300 mgの hCTをメチルポリエチレングリコールで変性した。反応混合物をアミコンYM10膜 (分子量カットオフ10kDa)上で4°Cで0.1M炭酸水素アンモニウム、pH 8.0に対し透析濾過して、未反応hCTを除去した。残留液を36mlに濃縮し、1.7M硫酸アンモニウムを含有する50mM燐酸ナトリウム、pH 7.0を用いて60mlにした。この溶液を0.68M 硫酸アンモニウムを含有する50mM燐酸ナトリウム中で平衡化した8mlのフェニル-スーパーローズ (phenyl-superose) カラム (Pharmacia/LKB)上で5×12mlのバッチとしてクロマトグラフィーにかけた。遊離のメチルポリエチレングリコールはこれらの条件下ではカラムに結合せず、洗浄により除去された。メチルポリエチレングリコールで変性されたhCTを50mM燐酸ナトリウムpH7.0で溶解した。溶解ペプチドをスペクトラポル (Spectrapor) 透析膜 (MWカットオフ6～8 kDa)を使用して水中に透析し、4°Cで濃縮することにより、酸加水分解後のアミノ酸分析により測定して、11 mg/mlの最終ペプチド濃度とした。共有結合したメチルポリエチレングリコールをhCT 1モル当り 1.5モル含有する生成物は生物学的活性を保持しておりかつ未変性原料物質を含有していなかった。

【0322】参考例29

メチルポリエチレングリコール5000で変性されたヒトインターロイキン-2 (IL-2)の調製

大腸菌中で製造された、凍結乾燥された組換え体IL-2をバイオソースインターナショナル (カルフォルニア) から入手した。大腸菌中でのIL-2の製造及びその後の精製は文献に記載されている (Kato等, Biochem, Biophys.

Res. Commun.130, 692(1988); Liang 等、Biochem.J. 229, 429(1985); Kathis 等、米国特許第4,569,790号明細書参照)。30mlの水中の211mgのIL-2の溶液を参考例3に記載の方法で分子量約5000のメチルポリエチレングリコール(IL-2上のアミノ基1個当り20当量)で変性し、精製した。最終生成物はタンパク質1モル当り、3.4モルのメチルポリエチレングリコールを含有しており、未変性の原料物質を含有しておらずそして生物学的活性を保持していた。

【0323】参考例30

pICIの構成

【0324】a) pTB357(ここではpLB004とも記載する)の構成

天然に産生するプラスミドRP4に見出される如く、プラスミドpTB357は抑制したテトラサイクリン耐性決定基を利用する。この抑制したプラスミド系ではテトラサイクリンの不在下でtetA遺伝子の発現を遮断し然るに大抵の薬剤耐性機構は構成発現を有する。

【0325】tet 遺伝子座はBarth 及びGrinter(J. Mol. Biol. 113; 455~474,1977)によりRP4上に先ず位置付けられた。このtet 遺伝子座は隣接遺伝子：構造上の耐性遺伝子及びtet R、リプレッサー遺伝子よりなることが示され、この領域を配列した(Klock等、J. Bacteriol. 161; 326~332,1985)。これらの遺伝子は隣接するBgl II-SmaI 及びSmaI-SamI 断片上に配置された。Bgl III の部位はRP4で特異的であるが5個のSmaIの部位(Lauka, Lurz及びFurste, Plasmid 10; 303-307,1983)がある。

【0326】i) tetA+tetR 遺伝子のクローン化

プラスミドRP4は文書に十分記載されており(Datta等のJ. Bacteriol 108:1244, 1971)、自由に入手し得る。更にはプラスミドRP4は承認番号第50078及び50437号としてthe National Collection of Type Cultures, 61 Colindale Avenue, London, NW9 5HT に対して寄託された。このプラスミドを含有するE.coli菌株は選択的な培養液中で生長させ、プラスミドDNAをHolmes and Quigley法(Holmes and Quigley, Anal. Biochem 114; 193~197, 1981)を拡大して単離した。プラスミドDNAを2.5M酢酸アンモニウムでの処理により除蛋白を行ないイソプロパノールで再沈澱させた。このプラスミドDNAを供給*40

5' AATTCGCATCGCGATCCATCGATC3'

3' GCGTACGCCCTAGGTAGCTAGAGCC5'

を有する合成オリゴヌクレオチドをクローン化した。これらの合成オリゴヌクレオチドはEcoRI 及びAvaI粘着末端に適合し且つSphI, BamHI 及びClaI部位を更に含有する。形質転換及び選択後に、コロニーはテトラサイクリン耐性決定基の減損について試験した。1つのクローンからのプラスミドDNAの配列を行なって予測した配列が正しいことを確認した。このプラスミドをpCH19と呼んだ。

*者の推奨する条件により制限酵素BglIIIで処理し、完全に切断した。次いで希釈した酵素及び短いインキュベーション時間を使用することによりXmaIによって部分的に切断した。XmaIはSmaIのイソシゾマーであるがその切断部位で4-ヌクレオチド粘着末端を生ずる。

【0327】ベクタープラスミドpUC8 (Yanisch-Perron, Vieira and Messing, Gene 33;103~119, 1985)は同様に調製され、BamHI 及びXmaIで完全に切断した。RP4断片は12°Cで16時間T4リガーゼで連結することによりこのベクター中にクローン化された。このベクターを使用して塩化カルシウム法(Maniatis等のCold Spring Harbor Laboratory, 1982)によりコンピテントとしたE.coli C600を形質転換した。次いで培養物をテトラサイクリン耐性用に選んだ媒質上に配置した。

【0328】E.coli C600は承認番号第QCSC 3004号としてE.coli Genetic Stock Centre, Yale University, 米国の如き多数のカルチュアコレクションを含めて多数の供給源から自由に入手し得る。E.coli C600の遺伝子型はK12 thr-1 leu B6 thi-1 hsd S1 lac Y1 ton A21 λ⁻ sup E44である。

【0329】この耐性を有する若干のコロニーを予期した表現型について点検した(アンピシリン及びテトラサイクリン耐性であるがカナマイシン耐性ではなくRP4それ自体を表わす)。適当な耐性を有するコロニーをプラスミドDNAの単離によりクローン分析にかけた(Holmes and Quigley法)。これらの調製物をEcoRI 及びHindIIIで切断し、ゲル電気泳動により分析した。これによってクローン化挿入物の寸法が確立されこれはRP4からのBglIII-XmaI-XmaI断片について予測された2.45kbであることが見出された。tetA及びtetR遺伝子を含有するこの断片を担持したクローンはpTB344と呼ばれた。

【0330】ii) pAT153からtet 遺伝子の取出し
RP4からtetA +tetRカセットを挿入する前にベクタープラスミドpAT153からtet 遺伝子を取り出して、遺伝的不安定性の源となり得る遺伝子複製を防止することが必要であった。またtet 遺伝子は非同族tetRによっては有効に抑制し得ない。取出しはプラスミドpAT153 DNAを単離しこれをEcoRI 及びAvaIで切断することにより行なった。これらの部位の間で配列SEQ ID No.56:

【0331】iii) tetA+tetR遺伝子の挿入

tetA及びtetR遺伝子はEcoRI 乃至PstI断片上のpTB344から単離された。pUC8ベクターはSspIで処理することにより破壊された。何故ならpCH19と同じ選択決定基(アンピシリン耐性)を担持するからである。プラスミドpCH19 DNAをEcoRI及びPstIで切断し次いでtet 遺伝子を担持する2.45kb断片で連結した。このプラスミドを使用してE.coli C600を形質転換し、培養物はテトラサイクリン

ン耐性コロニーについて選択しながらプレートアウト (plate out) するものである。tet遺伝子の挿入は、かくして pCH19 のアンピシリン耐性決定基を失うべき pCH19 中の bla 遺伝子の大部分を置換するように意図された。形質転換体からのアンピシリン耐性の減損は確認された。次いで数個のクローンを使用してプラスミドDNAを単離し、これを制限分析にかけた。これによって、構成したプラスミドは意図した構造を有することを確認した。このプラスミドを pTB351 と呼んだ。

【0332】iv) cer 配列の挿入

天然に産生するプラスミド ColEI は E. coli 中にきわめて安定に維持されるが、然るにその誘導体 pBR322 及び pAT153 は安定に維持されない。Summers 及び Sherratt (Cel 1, 36:1097 ~ 1103, 1984) が証明した所によればこれは親プラスミド中に存在する cer と呼ばれる短い (283 bp) 配列を含有しない誘導体によるものである。この配列は部位特異的プラスミドのマルチマーレゾリューション (multimer-resolution) 系を含有しこれによって相相同的な組換えによって形成されたプラスミド マルチマーの集積を防止する。かゝるマルチマーは細菌細胞の分割中の娘プラスミドの安定な遺伝を普通確保する分配処理に悪影響を有する。

【0333】cer 配列 (Summers, D 等 MCG, 201, p334 ~ 338, 1985) を、BamHI 及び TaqI で切り取ることにより 289bp 断片としてプラスミド pKS492 (D. Sherratt により提供された) から単離した。プラスミド pTB351 を E. coli の dam 菌株からDNAとして単離してその Clai 部位が dam + メチル化系によってブロックされるのを防止した。このDNAを BamHI 及び Clai で切取った (これらの部位の両方共このクローン化用の合成オリゴヌクレオチド上に導入されていた)。 cer 断片を切断ベクターで連結し、次いでこれを使用して E. coli C600 を形質転換し、選択はテトラサイクリンについて成された。形質転換体コロニーは AvaI 制限及びゲル電気泳動によりクローン分析を行なった。約 300bp の追加のDNAバンドの存在は cer 断片の獲得を示した。別の制限分析を使用して得られるプラスミドが適当な構造を有することを確認した。これらのプラスミドの1つは pTB357 (図7) と呼び、また pLB004 と呼んだ。

【0334】b) プラスミド pCH101

プラスミド pCH101 は pICI0020 (実施例1c参照) に相当するが、但し EcoRI-SalI 断片 (図1参照) は SEQ ID No 50 (図8参照) 及び Edge M.D. 等の Nucleic Acids Research 1983, Vol 11, p6419 ~ 6435 によって記載される如くインターフェロン α_2 遺伝子配列によって置換された。この点において、SEQ ID No 53 の3'-末端ATG コドンは、*

5' AGCTCCATATCGTACCAGATCTCTCGAGAGTACTT

GGTATACCATGGTCTAGAGAGCTCTCATGAAGATC 5'

を有する合成オリゴヌクレオチドをその場に挿入した。

クローンは新しい制限部位の獲得について分析し次いで

* 前記の Edge M.D. 等の Nucleic Acids Research reference のインターフェロン α_2 配列中のシステイン (アミノ酸1) をコードするTGT コドンの直前に存在する。かくして5'ヌクレオチド配列GATCCATG 及び相補的な3'ヌクレオチド配列GTACは前記文献のヌクレオチド配列から省略される。

【0335】c) pTB357 中への表現カセットの挿入

trp プロモーター、リボソーム結合部位及びインターフェロン α_2 遺伝子よりなる表現カセットを、EcoRI 乃至 SphI 制限断片上のプラスミド pCH101 (前記の(b) 参照) から単離した。この表現カセットを EcoRI 及び SphI で同様に切り取った製造ベクター (pTB357) (前記の(a) 参照) 中に連結させた。このDNAを使用して E. coli C600 のコンピテント培養物を形質転換させ、テトラサイクリン耐性コロニーを単離した。これらのコロニーの若干を、表現カセット上に担持した SstI 制限部位の獲得についてDNA クローン分析により試験した。この点に関して正のクローンは予期した構造が正確であるかを点検するために制限マッピング (mapping) により更に試験した。クローンはまたクーマシーブルーで染色したポリアクリルアミド-SPS ゲルについて分析した如くインターフェロン α_2 蛋白質を製造するための授与能力について点検された。1つのかゝる確認したクローンを ϕ LB005 と呼んだ。

【0336】d) pTB244 中へのT4転写終結体の挿入

SalI 乃至 HindIII 断片 (長さ67個の塩基対) (SEQ ID No 48 及び図6参照) の形のT4転写終結体 (ターミネーター) 配列を、SalI と HindIII との部位同志間の中間ベクター pTB 244 (欧州特許公告第237,269 号に記載) のマルチクローン化部位中に挿入した。クローン分析を使用してこの構造物 (pTB244 T4 ter) の構造を確認した。このベクターから、マルチクローン化部位の大部分とT4終結体とを含有する SstI 乃至 SphI 断片を次いで単離した。この断片を SstI 及び SphI で同様に切り取った pLB005 中に挿入し、これによってインターフェロン α_2 遺伝子を置換するが、trp プロモーター、マルチクローン化部位及びT4終結体よりなるカセットを残しておく。この構造物はクローン分析によって確認され、該プラスミドを pLB013 と呼んだ。

【0337】e) マルチクローン化部位の置換

pLB 013 中のマルチクローン化部位は若干の点でこのベクターには理想的ではない: SalI, BamHI 及び SmaI の部位は特異的でなくプラスミド上の他の所にも存在する。それ故この断片は SstI 及び XbaI (両方共独特である) で切断することにより切り出され、SEQ ID No. 51 の配列:

配列決定により確認した。1つのかゝるプラスミドを pL

B 014 と呼んだ。この仕方では挿入した新しいクローン化

部位は：NdeI、KpnI、BglIII、XhoI及びScaIであり、これらの部位に続いて先のXbaI及びSalIを有する。

【0338】f) 更なる修飾

pLB 014 中の隣接SstI及びNdeI部位は、恐らくはそれらのきわめて接近した位置の故に同時には又は順次にはの何れかでこれら両方の制限酵素によって切断できないことが見いだされた。それ故追加の配列をこれらの間に挿入した。これは、pLB 014 をSstI及びKpnIで切り取り次いでSEQ ID No.52

5' AGCTCAGCTGCAGCATATGGTAC
GTCGACGTCGTATAC 5'

の合成オリゴヌクレオチドを挿入することにより行なった。クローンは追加のPvuII 又はPstI部位の獲得について分析し次いで配列化により確認した。1つのかかるプラスミドをpLB015(pICI 0080)(図9参照)と呼んだ。このプラスミドはpLB 014 とは異なっておりSstI及びNdeIによって有効に切り取られる。これによって上流側のプロモーターに関して且つ予期すべき遺伝子のATG 開始コドンを与えるのに意図されるNdeIに関して正確に配置された種々のリボソーム結合部位の配列を挿入する場所を提供するものである。

【0339】参考例7

プラスミドpICI 1295(pCG 300 とも記載)の構成

【0340】a) pICI 1079 からpCG54 の調製

pICI 1079 はEcoRI とStyIとの制限部位同志間に次の要素：

- (i) ファージλからのCI 857；
 - (ii) λ_{PL} プロモーター；
 - (iii) 合成リボソーム結合部位；
 - (iv) 合成インターフェロンα₂ 遺伝子配列；
 - (v) SalIとStyIとの制限部位の間でファージT4から誘導された合成転写終結体配列；
- を収容するアンピシリン耐性の pAT153-誘導プラスミドである。この転写終結体のDNA 配列を図6及びSEQ ID No.53に示す。

【0341】pICI 1079 を図10に例示する。pICI 1079 はブタベスト条約により英国のNational Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB)に寄託されている(NCIMB No.40370, 寄託日1991年2月19日)。pCG54 は前記と同じプロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結体配列即ちλ_{PL}、RBS7及びT4を含有するが特異な蛋白質を調製するのにコードする遺伝子配列を欠いている表現ベクターを利用し得るために構成された。かかる構造体は、次後のクローニング操作によってこのベクター中に導入し得る何れかの有用な蛋白質を調製するために転写及びホーン訳を可能とする必須成分含有の塩基性表現ベクターの才能を提供するものである。

【0342】表現ベクターの構成は、それぞれのEcoRI 及びSalI部位でpICI 1079 の制限エンドヌクレアーゼ開裂によって開始された。この開裂工程によって、プラス

ミドの複製及び抗生物質耐性機能の遺伝子プラスミド転写終結体配列で完成するpICI 1079 バックボーンを含有するベクター断片を放出した。該断片を、DNA 断片の最終精製用のゼネクリーン(Geneclean) を使用してアガロースゲル精製工程によって単離した。

【0343】このベクター断片に、寸法が大体1.2kb のより小さな別のDNA 断片を導入した。この別のDNA 断片は例えばDNA 合成によって又は前記の如くpICI 1079 から得られた小さなEcoRI-SalI制限断片の特定部位の突然誘発又はPCR 突然変異誘発によって得ることができる。この別の断片はpICI 1079 に当初から存在するのと正しく当量のプロモーターとリボソーム結合部位配列とを含有し且つ更にはそれぞれその5'及び3'末端で利用できるEcoRI 及びSalI部位とを有し、こうしてpICI 1079 断片に連結するための相溶性末端を提供するものである。Gibco-BRL酵素T4 DNAリガーゼ及びそのそれぞれの緩衝液の存在下で連結反応を行なうと構成物pCG54 が形成された。

【0344】この構成物を含有するクローンは、或る分量の連結反応混合物を菌株HB 101のE.coliコンピテント細胞に形質転換させるのに続いて当初から単離された。回収した構成物pCG54 は寸法が3.682kb であり、図11に特徴付けたマップに概説した必須要件を含有した。

【0345】b) pCG54 からpCG61 の調製 (pICI54とも記載)

合成オリゴヌクレオチド配列は、T7A3プロモーター用の自然の配列と、これに隣接してクローン化した何れかのポリペプチド遺伝子配列の正確な処理を可能とする有効なホーン訳開始領域を提供する配列との両方を含有するように設計された。この後者領域用の適当な候補配列はRBS1、trp リボソーム結合配列と同定された。それ故SEQ ID No54 及びSEQ ID No.55として同定された2種の相補的なオリゴヌクレオチドは、T7A3プロモーターとRBS1配列とを組入れた二本鎖DNA リンカーを生成するのに合成された。

【0346】オリゴヌクレオチドはABI 遺伝子シンセサイザーを用いて標準の記録書によって84量体(84mers)として調製された。オリゴヌクレオチドは、二本鎖形において合成断片がそれぞれ5'及び3'末端で制限エンドヌクレアーゼ酵素の部位EcoRI 及びKpnIを有するように設計された。それらの長さにより、オリゴマーはHPLCによって精製できず、精製は10%アクリルアミド：7M尿素ゲルを用いてアクリルアミドゲル電気泳動により行なった。

【0347】精製前に、オリゴマーはそれらが正確な寸法を有するのみならずまた調製した試料がそれらの最大割合として所要のオリゴマーを含有し、合成の副生物として生ずるより小さな二次的な汚染性オリゴヌクレオチドを高割合で含有しないように確保するためにサイジングゲル(sizing gel)について先ず点検した。

【0348】アクリルアミドゲルはゲル重合用の触媒と

10

20

30

40

50

して使用した過硫酸アンモニウム及びN, N, N', N'- テトラメチルエチレンジアミンを用いての標準法により調製した。オリゴヌクレオチドのサイジングは電気泳動後にそれらが肉眼で見えるように必要とされる。それ故²² Pを用いて試験を放射能で識別することが必要であった。これによって電気泳動に続いてオートラジオグラフィにより試料の特性を評価することができた。

【0349】オリゴヌクレオチド試料は磷酸化せずに粗製の形で供給された。酵素T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて磷酸化により試料を5'末端で高温標識できる点

【0350】オリゴマーは磷酸化しない形での合成から提供され、こうして精製後には各々のオリゴマーは磷酸化反応を個々に受け、そこでATP を使用してT4ポリヌクレオチドキナーゼの存在下に各々の分子の5'末端を磷酸化した(Molecular Cloning ;A Laboratory manual 2版, Sambrook, Fritsch 及びManiatis, p5, 68~5, 71参照)。磷酸化したからには、2個の相補的なオリゴヌクレオチドは互いにアニーリングされてT7A3プロモーターとRBS1配列とを含有する二本鎖DNA 重複体を形成した。

【0351】ベクター分子pCG54 は制限酵素EcoRI 及びKpnIで開裂された。制限切断により、 λ_{pL} プロモーターとRBS1配列とを含有する2.3kb ベクター断片と1.1kb 断片とを生成した。このクローニングは λ_{pL} -RBS1 配列を、T7A3-RBS1 配列含有EcoRI ~KpnI合成断片で置換するように計画される。PCG 54の切断から得られる2.3kb ベクター断片は、アガロース断片からDNA を取出すためアガロースゲル電気泳動及びゼネクリーン方法を用いて通常の記録書により精製した。84bp EcoRI-KpnI 合成断片を、前述の如く調製したベクター分子に連結させ、連結したDNA を使用してE.coli HB 101 細胞を形質転換した。正の組換え体クローンの選択はアンピシリン耐性によるものであった。形質転換に続いて、組換えプラスミドを含有する多数のコロニーをスクリーニングの目的に選択した。

【0352】クローニング中にベクターに組込まれた合成フラグメントは、簡単なスクリーニング方法として組換えプラスミドDNA 試料の制限分析を不適当とさせるような寸法(84重体)を有するものであった。かかる小さな寸法の挿入物はアガロースゲル電気泳動によっては容易に明らかでない。断片それ自体は、その存在の診断となり得る内部制限エンドヌクレアーゼ開裂部位を含有しない。それ故組換えクローンの最初のスクリーニングはコロニーハイブリダイゼーション(hybridisation)の方法によるものであった(Gruenstein 及びHozness Proc.Natl Acad, Sci 72, 3961(1975)参照)。組換え体クローンからの不動態化プラスミドDNA を含有するニトロセルロースフィルターは、合成アニール化オリゴヌクレオチドSEQ ID No.54及びSEQ ID No.55の無作為放射性標識によって調製されたプローブに対してハイブリッド化し

た。DNA は α^{32} P-dCTPを用いて標識し、37°Cで2時間クレナウ(Klenow)ポリメラーゼを用いてインキュベーションを行なった。正のハイブリダイゼーション反応を生成する組換え体コロニーはプラスミドDNA 調製のために選択された。プラスミドDNA は純度を確保するように、CsCl勾配密度の遠心分離を組入れた比較的大規模の方法によって各々の場合に調製された。"Molecular Cloning-A laboratory manual"第2版、Sambrook, Fritsch 及びManiatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) p1.42 ~1.52参照。かかる方法によってDNAを調製すると次後のクローニング操作及び配列分析に使用するのに適当な高品質DNA 物質を確保する。

【0353】組換え体クローンから単離した全てのプラスミドDNA を配列分析により第2のスクリーン中に包含させて、クローニング接合部でのオリゴヌクレオチド配列及びT7A3-RBS1 断片それ自体のオリゴヌクレオチド配列は絶対に正しいように確保する。使用した配列用の記録書(プロトコル)はセクエナーゼ(Sequenase)の記録書であり、使用するのに選択した配列用プライマーは例えばpBR322 UP(pBR322ユニバーサルプライマ)であった。塩基配列決定はSangerジデオキシ連鎖終結配列技術を用いて行なった。適当な配列を有するクローンは新規な表現構成物pCG61 として表示され、T7A3プロモーターとRBS1配列とT4ターミネーター配列とを含有した(図12参照)。

【0354】c) pCG61 からpCG300 (pICI1295として記載した)の調製

G-CSF 同族体[Ser^{17,27}] hu G-CSFの構成に伴う配列工程及び合成工程は参考例3に記載される如くである(図4及び図5参照)。このG-CSF 同族体配列は、遺伝子をプラスミドpSTP1 に組入れてpICI1107を得た構造物から単離された(実施例2参照)。pICI1107をSca Iで切断し、大きな断片はアガロースゲル電気泳動及びゼネクリーン精製に続いて単離された。次いでこの断片を制限酵素エンドヌクレアーゼSal Iで切断して、pCG61 にクローニングするのに適当なScaI~SalI制限断片上に[Met⁻¹, Ser^{17,27}] hu G-CSF遺伝子を生成した(図12参照)。

【0355】ScaIでの制限に続いて所要の断片は再びアガロースゲル精製技術を使用して単離した。ベクター分子pCG61 は制限酵素KpnIで切断した。この酵素を用いての開裂では3'-オーバーハング(overhang)を生成し次いでこれを酵素T4ポリメラーゼの使用によりブラントエンドとさせた"Molecular Cloning-A Laboratory manual"第2版、Sambrook, Fritsch 及びManiatis p5.44~5.47参照。T4ポリメラーゼ活性は70°Cで30分間インキュベーションすることにより熱不活性化され、DNA はエタノール沈澱により回収された。得られるベレットを無菌蒸留水に溶解させ、溶解したDNA をSal Iで開裂した。Kpn I (今やブラントエンドとした)~Sal Iベクター断

113

面は、エタノール沈澱続いてのアガロースゲル電気泳動及び精製技術により回収した。

【0356】次いでScaI～SalI[Met⁻¹,Ser¹⁷⁻²⁷] hu G-CSF断片を、プラントエンドとさせたKpn I～Sal Iベクター中に連結させた。連結したDNAをE.coli菌株HB101中に形質転換させた。組換え体クローンの選択はアンピシリン耐性についてであった。

【0357】強力な組換え体クローンの最初のスクリーニングはハイブリダイゼーションにより行なった。放射能標識のプロンプはプラスミドpICI1107から調製したEcoRI～Sal I断片([Met⁻¹,Ser¹⁷⁻²⁷] hu G-CSF遺伝子配列を含有する)を無作為に標識付けすることにより調製された。このプロンプを、DNAがニトロセルロースフィルターの上に固定されたコロニーに対するハイブリダイゼーションで使用した。続いてプラスミドDNAはこのスクリーンでハイブリダイズされた24個のクローンから調製した。全てのDNA調製は迅速なミニ調製法によるものであった。Birnboim及びDolyのNucleic Acids Research, 7, 1513, 1979参照。これらの組換え体DNA調*

(2) 配列情報 ID No 1 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 62

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(xi)配列の名称 : SEQ ID No 1 :

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC 47
CTG CTG AAG TGT CTC 62

【0360】

(2) 配列情報 ID No 2 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 64

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(xi)配列の名称 : SEQ ID No 2 :

CTG TTC CAG ACA CTT CAG CAG GAA AGA CTG CGG CAG AGA GCT TGC 45
TGG ACC CAG TGG AGT ACTG 64

【0361】

114

* 製物は制限分析により別のスクリーンにかけた。表現カセット内で特異な部位である、BamHIを有するDNAの線状化(linearization)は[Met⁻¹,Ser¹⁷⁻²⁷] hu G-CSF配列の存在を示すものである。

【0358】配列の分析を行なって[Met⁻¹,Ser¹⁷⁻²⁷] hu G-CSF遺伝子の存在を確認し且つクローン化接合部の塩基配列及び[Ser¹⁷⁻²⁷] hu G-CSF遺伝子全体に亘っての塩基配列は正しく適当であることを立証した。この目的のために、純度を確保するCsCl勾配密度遠心分離技術を用いて16個の組換え体クローンから大規模プラスミドDNA試料を調製した。配列決定工程は配列記録書により行ない、選択した配列決定プライマーはpBR322ユニバーサルプライマー(EcoRI)であった。組換え体クローンの2種は[Met⁻¹,Ser¹⁷⁻²⁷] hu G-CSF断片のSca I末端で且つG-CSFペプチド配列それ自体に亘って正しい塩基配列を含有した。クローンは表現構成物pCG300として同定された(図14参照)。

【0359】

115

116

(2) 配列情報 ID No 3:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 60

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1) 配列の名称: SEQ ID No 3:

GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC GAT GGT GCG GCT CTG CAG GAA 45
 AAG CTG TGC GCA ACC 60

【0362】

(2) 配列情報 ID No 4:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 60

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1) 配列の名称: SEQ ID No 4:

TTT GTA GGT TGC GCA CAG CTT TTC CTG CAG AGC CGC ACC ATC GCC 45
 TTG AAT TTT ACG TAC 60

【0363】

(2) 配列情報 ID No 5:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 48

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1) 配列の名称: SEQ ID No 5:

TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTC 48

【0364】

(2) 配列情報 ID No 6:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 51

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1) 配列の名称: SEQ ID No 6:

CGG GAT CCC CAG ACA GTG ACC GAG CAG CAC CAG TTC CTC AGG GTG 45
 GCA CAG 51

【0365】

(2) 配列情報 ID No 7 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 63

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 7:

GGG ATC CCG TGG GCT CCA CTG AGC TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA	45
CAA CTG GCA GGC TGC TTG	63

[0366]

(2) 配列情報 ID No 8 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 60

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 8:

CTG GCT CAA GCA GCC TGC CAG TTG TAA AGC TTG GGA CGG GCA AGA	45
GCT CAG TGG AGC CCA	60

[0367]

(2) 配列情報 ID No 9 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 68

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 9:

AGC CAG CTG CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG	45
GCT CTA GAA GGC ATC TCT	63

[0368]

(2) 配列情報 ID No 10 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 63

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 10 :

TTC AGG AGA GAT GCC TTC TAG AGC CTG CAG CAG ACC CTG GTA CAG	45
GAA CAG ACC GGA GTG CAG	63

[0369]

(2) 配列情報 ID No 11 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 60

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 11

CCT GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT GCC 45
GAC TTC GCT ACT ACC 60

[0370]

(2) 配列情報 ID No 12 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 63

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 12:

TTG CCA TAT GGT AGT AGC GAA GTC GGC AAC GTC CAG CTG CAG TGT 45
GTC CAG GGT GGG CCC CAA 63

[0371]

(2) 配列情報 ID No 13 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 63

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 13 :

ATA TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG GCT CCG GCA CTG CAG 45
CCG ACT CAG GGT GCG ATG 63

[0372]

(2) 配列情報 ID No 14 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 60

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 14:

TGC TGC CAT CGC ACC CTG AGT CCG CTG CAG TGC CCG AGC CAT ACC 45
CAG TTC CTC CAT CTG 60

[0373]

121

122

(2) 配列情報 ID No 15:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 60

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(xi)配列の名称: SEQ ID No 15:

CCA GCA TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT GTT CTG	45
GTT GCC TCC CAT CTT	60

【0374】

(2) 配列情報 ID No 16:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 60

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(xi)配列の名称: SEQ ID No 16:

GCT CTG AAG ATG GGA GGC AAC CAG AAC ACC GCC TGC GCG CCG CTG	45
GAA AGC AGA GGC GAA	60

【0375】

(2) 配列情報 ID No 17:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 55

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(xi)配列の名称: SEQ ID No 17:

CAG AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC	45
CAG CCG TTAG	55

【0376】

(2) 配列情報 ID No 18:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 53

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(xi)配列の名称: SEQ ID No 18:

TCGACTTA CGG CTG GGC CAG GTG ACG CAG AAC CCG GTA AGA CAC CTC	47
GAG GAA	53

【0377】

123

124

(2) 配列情報 ID No 19:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 21

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 19:

TACAAC TGGC AGGCTGCTTG A

21

【0378】

(2) 配列情報 ID No 20:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 21

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 20

GACGTTGCCG ACTTCGCTAC T

21

【0379】

(2) 配列情報 ID No 21:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 21

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 21:

TGCCGGAGCC ATACCCAGTT C

21

【0380】

(2) 配列情報 ID No 22:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 21

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 22:

GCCTGCCAGT TGTAAAGCTT G

21

【0381】

125

126

(2) 配列情報 ID No 23 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 26

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 23:

GCACCATGGC CTGAATTTT ACGTAG

26

[0382]

(2) 配列情報 ID No 24:

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 62

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 24:

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC

47

CTG CTG AAG TCT CTC

62

[0383]

(2) 配列情報 ID No 25 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 64

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 25:

CTG TTC GAG AGA CTT CAG CAG GAA AGA CTG CCG CAG AGA GCT TGC

45

TGG ACC CAG TGG AGT ACTG

64

[0384]

(2) 配列情報 ID No 26 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 60

(B) 種類 : 核酸

(C) ストランド : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 26

GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC AGC GGT GCG GCT CTG CAG GAA

45

AAG CTG TGC GCA ACC

60

[0385]

127

128

(2) 配列情報 ID No 27:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 60

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(xi)配列の名称: SEQ ID No 27:

TTT GTA GGT TGC GCA CAG CTT TTC CTG CAG AGC CGC ACC GCT GCC
TTG AAT TTT ACG TAC

45

60

【0386】

(2) 配列情報 ID No 28:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 28

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(xi)配列の名称: SEQ ID No 28:

CTT CAG CAG GAA AGA ACG CGG CAG AGA GC

29

【0387】

(2) 配列情報 ID No 29:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 33

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(xi)配列の名称: SEQ ID No 29

GC TTG GGA AGA GCA AGA GCT CAG AGA AGC CCA C

33

【0388】

(2) 配列情報 ID No 30:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 40

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(xi)配列の名称: SEQ ID No 30:

CTG TTG CCA TAT GCT AGA AGC GAA GTC TTC AAC GTC CAG C

40

【0389】

(2) 配列情報 ID No 31 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 27

(B) 種類 : 核酸

(C) スtrand : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 31 :

GCT CAG TGG AGC TTT CGG GAT CCC CAG

27

[0390]

(2) 配列情報 ID No 32 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 27

(B) 種類 : 核酸

(C) スtrand : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 32:

ACG CAG AAC GCG GCG AGA CAC CTC GAG

27

[0391]

(2) 配列情報 ID No 33:

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 29

(B) 種類 : 核酸

(C) スtrand : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 33:

G TTC CAG AGA CTT TTC CAG GAA AGA CTG C

29

[0392]

(2) 配列情報 ID No 34 :

(1) 配列の特性 :

(A) 長さ : 33

(B) 種類 : 核酸

(C) スtrand : 一重鎖

(D) 形状 : 線状

(x1)配列の名称 : SEQ ID No 34:

C CTG CAG TTT CGC AGC GCT AGC TTG AAT TTT AC

33

[0393]

131

132

- (2) 配列情報 ID No 35 :
 (1) 配列の特性 :
 (A) 長さ : 37
 (B) 種類 : 核酸
 (C) スtrand : 一重鎖
 (D) 形状 : 線状
 (x1) 配列の名称 : SEQ ID No 35

CAG AGA GTG AGC GAG CTT CAC CAG TTC CTC AGC GTG G

37

【0394】

- (2) 配列情報 ID No 36 :
 (1) 配列の特性 :
 (A) 長さ : 29
 (B) 種類 : 核酸
 (C) スtrand : 一重鎖
 (D) 形状 : 線状
 (x1) 配列の名称 : SEQ ID No 36:

GCT CAG TGG AGC TTT CGG GAT AGC CAG AG

29

【0395】

- (2) 配列情報 ID No 37 :
 (1) 配列の特性 :
 (A) 長さ : 30
 (B) 種類 : 核酸
 (C) スtrand : 一重鎖
 (D) 形状 : 線状
 (x1) 配列の名称 : SEQ ID No 37:

CAG CTT TTC CTG CAG ACG CGC AGC GCT AGC

30

【0396】

- (2) 配列情報 ID No 38 :
 (1) 配列の特性 :
 (A) 長さ : 29
 (B) 種類 : 核酸
 (C) スtrand : 一重鎖
 (D) 形状 : 線状
 (x1) 配列の名称 : SEQ ID No 38:

CC GCT GCC TTG AAT ACG ACG TAC CTG TTC

29

【0397】

133

134

(2) 配列情報 ID No 39:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 30

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 39:

GGT TGC GCA CAG ACG TTC CTG CAG AGC CGC

30

【0398】

(2) 配列情報 ID No 40:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 29

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 40:

G GTG GCA CAG ACG GTA GGT TGC GCA CAG C

29

【0399】

(2) 配列情報 ID No 41:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 45

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 41

CG CGG CAG AGA GCT TGC ACG GTA GGT TGG AGC CAT TGTCGATACC

45

【0400】

(2) 配列情報 ID No 42:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 31

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 42:

G TAC CTG TTC GAG AGA ACG CAG CAG GAA AGA

31

【0401】

135

136

(2) 配列情報 ID No 43:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 174/177 アミノ酸

(B) 種類: アミノ酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 43:

Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln
1				5					10	
Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Val	Arg
			15					20		
Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Glu
		25					30			
Lys	Leu (Val	Ser	Glu) _m	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	
	35							40		
Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	His
			45					50		
Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser
		55					60			
Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys
		65				70				
Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr
75					80					85
Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser
				90					95	
Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln
			100					105		

137	Leu	Asp	Val	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	138
			110					115				
	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro	Ala	
		120					125					
	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	
	130					135					140	
	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	
					145					150		
	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	Phe	Leu	Glu	
				155					160			
	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Gln	
			165					170				
	Pro											
	(m=0又は1)											

[0402]

(2) 配列情報 ID No 44:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 168+168

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 二重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 44:

AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT	50
GACCGT TTATAAGACT TTAAGTCTGACA ACTGTTAATT AGTAGCTTGA	46
AATGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGTCGAC CTGCAGGCAT GCAAGCTTAG	140
TTACCATGGG CCCCTAGGAG ATCTCAGCTG GACGTCCGTA CGTTCCAATC	136
CCCGCCTAAT GAGCGGGCTT TTTTAT	168
GGGCGGATTA CTCGCCGAA AAAAAATAGC	166

[0403]

(2) 配列情報 ID No 45:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 534

(B) 種類: 対応する蛋白質とのヌクレオチド

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 45:

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG 50

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu

1

5

10

CTG AAG TGT CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC GAT GGT GCG GCT 98

Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala

15

20

25

30

CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA 146

Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu

35

40

45

CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG TGG GCT CCA CTG AGC 194

Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser

50

55

60

TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG CTG 242

Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu

65

70

75

141	142	
CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC	290	
His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly		
80	85	90
ATC TCT CCT GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT	338	
Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val		
95	100	105
GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG	386	
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met		
115	120	125
GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG CCA GCA TTC GCC TCT	434	
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser		
130	135	140
GCT TTC CAG CCG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT CAG	482	
Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln		
145	145	155
AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG	530	
Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro		
160	165	170
TAA G	534	

【0404】

(2) 配列情報 ID No 40:

30 (1) 配列の特性:

(A) 長さ: 534

(B) 種類: 対応する蛋白質とのヌクレオチド

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(xi) 配列の名称: SEQ ID No 40:

143	144
AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG	50
Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu	
1 5 10	
CTG AAG TCT CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC AGC GGT GCG GCT	98
Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Ser Gly Ala Ala	
15 20 25 30	
CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA	146
Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu	
35 40 45	
CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG TGG GCT CCA CTG AGC	194
Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser	
50 55 60	
TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG CTG	242
Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu	
65 70 75	
CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC	290
His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly	
80 85 90	
ATC TCT CCT GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT	338
Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val	
95 100 105 110	
GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG	386
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met	
115 120 125	
GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG CCA GCA TTC GCC TCT	434
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser	
130 135 140	
GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT CAG	482
Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln	
145 145 155	
AGC TTC CTC GAG CTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG	530
Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro	
160 165 170 174	
TAA G	534

【0405】

- (2) 配列情報 ID No 47:
 (i) 配列の特性:
 (A) 長さ: 81
 (B) 種類: 核酸
 (C) ストランド: 一重鎖
 (D) 形状: 線状

GAATTCAACA AAACGGTTGA CAACATGAAG TAAACACGGT ACGATGIACC 50
 ACAAGTTCAC GTAAAAAGGG TATCGACAATG 81

【0406】

- (2) 配列情報 ID No 48:
 (i) 配列の特性:
 (A) 長さ: 67+67塩基
 (B) 種類: ヌクレオチド
 (C) ストランド: 二重鎖
 (D) 形状: 線状

TCGACATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCCTTTTITA TTTTAAAAAG 60
 GTAATA TAATGATTAA TTAACCCCTG GGATCTCCAG GGGAAAAAAT AAAATTTTTC 56
 CATGCCGA 67
 GTACGCCTCGA 67

【0407】

- (2) 配列情報 ID No 49:
 (i) 配列の特性:
 (A) 長さ: 72+72塩基
 (B) 種類: 核酸
 (C) ストランド: 二重鎖
 (D) 形状: 線状
 (x1)配列の名称: SEQ ID No 49

TCGACATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCCTTTTITA TTTTAAAAAG 60
 GTAATA TAATGATTAA TTAACCCCTG GGATCTCCAG GGGAAAAAAT AAAATTTTTC 56
 CATGCCGATC CC 72
 GTACGCCTAG GGGAAC 72

【0408】

(2) 配列情報 ID No 50:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 118塩基

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No50:

AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT	50
AGTTAACTAG TACGCAGAGC TCAATCTAGA GGGTATTAAT AATGTTCCCA	100
TTGGAGGATG ATTAAATG	118

[0409]

(2) 配列情報 ID No 51:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 85+85塩基

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 二重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 51:

AGCTCCATAT GGTACCAGAT CTCTCGAGAG TACTT	35
GGTATA CCATGGTCTA GAGAGCTCTC ATGAAGATC	35

[0410]

(2) 配列情報 ID No 52:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 28+15塩基

(B) 種類: 核酸

(C) スtrand: 二重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 52

AGCTCAGCTC CAGCATATGG TAC	23
GTCGAC GTCGTATAC	15

[0411]

149

150

(2) 配列情報 ID No 53:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 72+72塩基

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 二重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 53:

TOGACATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCCTTTTITA TTTTAAAAAG 60
 GTAATA TAATGATTAA TTAACCCCTG GGATCTCCAG CGCAAAAAAT AAAATTTTTC 56

CATGCGGATC CC 72
 GTACGCCTAG GGGAAC 72

【0412】

(2) 配列情報 ID No 54:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 84

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 54:

AAT TCA ACA AAA CGG TTG ACA ACA TGA AGT AAA CAC GGT ACG ATG 45
 TAC CAC AAG TTC ACG TAA AAA GGG TAT CGA CAA TGG TAC 84

【0413】

* *

(2) 配列情報 ID No 55:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 76

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 一重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 55

CAT TGT CGA TAC CCT TTT TAC CTG AAC TTG TCG TAC ATC GTA CCG 45
 TGT TTA CTT CAT GTT GTC AAC CGT TTT GTT G 76

【0414】

(2) 配列情報 ID No 56:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 24+24

(B) 種類: 核酸

(C) ストランド: 二重鎖

(D) 形状: 線状

(x1)配列の名称: SEQ ID No 56:

AATTCGCATG CGGATCCATC GATC 24
 GCGTAC GCCTAGGTAG CTAGAGCC 24

【図面の簡単な説明】

オチド配列を示す。

【図1】参考例5で述べられている167bp 断面のヌクレ 50 【図2】天然ヒトG-CSF 及び制限部位のアミノ酸配列及

151

び対応するヌクレオチド配列を示す。

【図3】天然ヒトG-CSF及び制限部位のアミノ酸配列及び対応するヌクレオチド配列を示す。

【図4】[Ser^{17,27}] hu G-CSF及び制限部位のアミノ酸配列及び対応するヌクレオチド配列を示す。

【図5】[Ser^{17,27}] hu G-CSF及び制限部位のアミノ酸配列及び対応するヌクレオチド配列を示す。

【図6】(a) 末端SalI及びHindIII 制限部位及び(b) 末端SalI及びStyI制限部位を有する、T4転写ターミネーターのヌクレオチド配列を示す。

【図7】pTB357 (pLB004とも称する) の制限マップを示す。

【図8】参考例6 (b) 述べられているが、インターフェロン α 、遺伝子配列は省略されているRcoRI-SalI断片のヌクレオチド配列を示す。

【図9】pLB015(pICI 0080とも称する) の制限マップを示す。

【図10】pICI 1079 の制限マップを示す。

【図11】pICI 54(pCG54とも称する) の制限マップを示す。

【図12】pCG 61の制限マップを示す。

【図13】pICI 1107 の制限マップ(斜線部分は[Ser^{17,27}] hu G-CSFをコードする遺伝子配列を表わす)を示す。

【図14】pCG 300(pICI 1295とも称する) の制限マップを示す。

【図15】50%d, 1-ラクチド/50%グリコリド共重合体連続放出型医薬組成物A及びB(実施例4及び5参照)からのPEG[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFの放出量を示す(これらの組成物は氷酢酸法で調製されている)。

【図16】50%d, 1-ラクチド/50%グリコリド共重合体連続放出型医薬組成物C及びD(比較例1及び2参

152

* 照) からの非ベグリル化[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFの放出量を示す; 組成物Cは非ベグリル化[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFだけを含有しており、組成物Dは非ベグリル化[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFとメチルPEG 5000との混合物を含有している(これらの組成物は氷酢酸法で調製されている)。

【図17】2つの異なる50%d, 1-ラクチド/50%グリコリド共重合体連続放出型医薬組成物G及びH(実施例24参照)からの、PEG 5000[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFの累積放出量を示す(かかる組成物は水性製造法によって調製されている)。

【図18】[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFだけを含有する50%d, 1-ラクチド/50%グリコリド共重合体連続放出型医薬組成物(比較例3参照)及び[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFとメチルPEG 5000との混合物を含有する50%d, 1-ラクチド/50%グリコリド共重合体連続放出型医薬組成物(比較例4参照)(これらの組成物はいずれも水性製造法によって調製)からの、[Met¹,Ser^{17,27}] hu G-CSFの累積放出量を示す。

【図19】50%d, 1-ラクチド/50%グリコリド共重合体・連続放出型医薬組成物E(実施例3参照)、K(実施例25参照)及びM(比較例5参照)(組成物Eは氷酢酸法により、組成物K及びMは水性製造法により調製)からの、PEG 5000[Met¹,Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Lys³⁰] hu G-CSFの累積放出量を示す。

【図20】50%d, 1-ラクチド/50%グリコリド共重合体・連続放出型医薬組成物F(実施例4参照)、L(実施例26参照)及びN(比較例6参照)(組成物Fは氷酢酸法により、組成物L及びNは水性製造法により調製)からのPEG 5000[Met¹,Arg¹,Ser^{17,27,60,65}] hu G-CSFの累積放出量を示す。

【図6】

EcoRI

AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT

HpaI

AGTTAACTAG TACGCAGAGC TCAATCTAGA GGGTATTAAT AATGTTCCCA

TTGGAGGATG ATTAATG

【図1】

EcoRI

AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT 50
 GACCGT TTATAAGACT TTA CTGACA ACTGTTAATT AGTAGCTTGA 46

HpaI

AGTAACTAG TACGCAAGTT CACGTAAAAA GGGTATCGAC 90
 TCAATTGATC ATGCGTTCAA GTGCATTTTT CCCATAGCTG 86

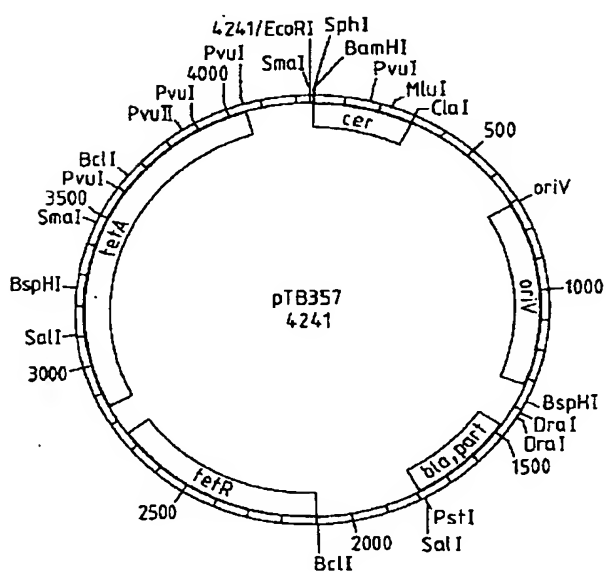
KpnI BamHI XbaI SalI PstI SphI

AATGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGTCGAC CTGCAGGCAT GCAAGCTTAG 140
 TTACCATGGG CCCCTAGGAG ATCTCAGCTG GACGTCCGTA CGTTCGAATC 136

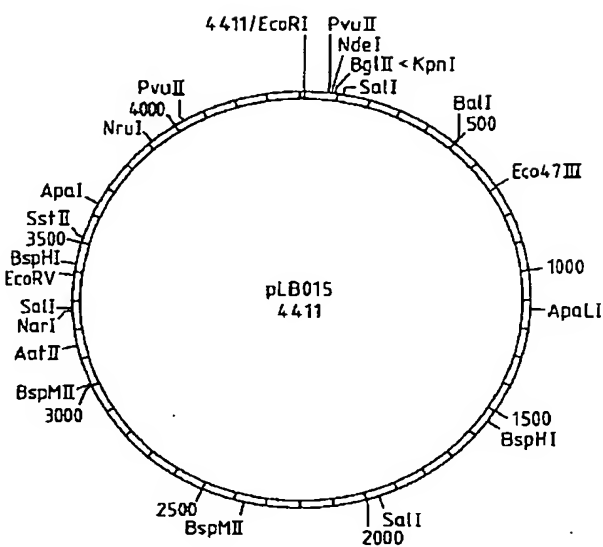
ClaI

CCCGCCTAAT GAGCGGGCTT TTTTAT 168
 GGGCGGATTA CTCGCCGAA AAAAAATAGC 166

【図5】



【図7】



TGG GCT CCA CTG AGC TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG 219
 ACC CGA GGT GAC TCG AGA ACG GGC AGG GTT CGA AAT GTT GAC CGT CCG ACG AAC TCG GTC
 Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln
 60 65 70 75
 XbaI

【図2】

【図2 - 続き】

```

CTG CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC ATC TCT CCT 299
GAC GTG AGG CCA GAC AAG GAC ATG GTC CCA GAC GAC GTC CGA GAT CTT CCG TAG AGA GGA
Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro
80 85 90 95
GAA TTG CCG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GGT GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA 359
CTT AAC CCC GGG TGG GAC CTG TGT GAC GTC GAC CTG CAA CGG CTG AAG CGA TGA TGG TAT
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile
100 105 110 115
TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT CCG ATG 419
ACC GTT GTC TAC CTC CTT GAC CCA TAC CGA GGC CGT GAC GTC GGC TGA GTC CCA CGC TAC
Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met
120 125 130 135
CCA GCA TTC GCC TCT GCT TTC CAG CCG CGC GCA GGC GGT GGT CTG GCT GCC TCC CAT CTT 479
GGT CGT AAG CCG ACA CGA AAG CTC GCC GCG CGT CCG CCA CAA GAC CAA CGG AGG GTA GAA
Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu
140 145 150 155
CAG ACC TTC CTC GAG CTG TCT TAC CCG GTC GTC CTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG TAA G 534
CTC TCG AAG GAG CTC CAC ACA ATG CCG CAA GAC GCA CTG CAC CCG GTC GGC ATT CAGCT
Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
160 165 170 174

```

NdeI

BssHII

SalI

XhoI

EcoRI ScaI

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG CTG AAG TCT 59
GTCA TGA GGT GAC CCA GGT TCG AGA GAC GGC GTC AGA AAG GAC GAC TTC AGA
Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Ser 15

SnaBI

FspI

CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC AGC GGT GCG GCT CTG CAG GAA AAG CTG TGC CCA 119
GAG CTT GTC CAT GCA TTT TAA GTT CCG TCG CCA GGC CCA GAC GTC CTT TTC GAC ACG CGT
Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Ser Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala 35

HstII

DamII

ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA CTG CTG CTG CTT CAC TCT CTG GCG ATC CCG 179
TGG ATG TTT GAC ACG GTG GGA CTC CTT GAC CAC GAC GAG CCA GAG CCA GAC CCC TAG GGC
Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro 55

SacI

HindIII

TGG GCT CCA CTG AGC TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG 219
ACC CGA GGT GAC TCG AGA ACG GGC AGG GTT CGA AAT GTT GAC CGT CCG ACG AAC TCG GTC
Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln 75

XbaI

CTG CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC ATC TCT CCT 299
GAC GTG AGG CCA GAC AAG GAC ATG GTC CCA GAC GAC GTC CGA GAT CTT CCG TAG AGA GGA
Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro 95

NdeI

【図3】

(81)

【図3 - 続き】

GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA	359
CTT AAC CCC GGG TGG GAC CTG TGT GAC GTC CAA CGG CTG AAG CGA TGA TGG TAT	
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile	115
100	
TCG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG	419
ACC GTT GTC TAC CTC CTT GAC CCA TAC CGA GGC CGT GAC CTC GGC TGA GTC CCA CGC TAC	
Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met	135
120	
125	
BssHII	
CCA GCA TTC GCC TCT GCT TTC CAG CCG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT	479
CGT CGT AAG CCG AGA CGA AAG GTC GCC CGC CGT CCG CCA CAA CAC CAA CGG ACG GTA GAA	
Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu	155
140	
145	
XhoI	
CAG AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG TAA G	534
GTC TCG AAG GAG CTC CAC AGA ATG GCG CAA GAC GCA GTG GAC CGG GTC GGC ATT CAGCT	
Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro	174
160	
165	
170	
Sali	

【図4】

TRANSCRIPTION TERMINATION SEQUENCE

a)

SalI

5' TCGACATTATATTACTAATTAATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTAA
 3' GTAATATAATGATTAATTAACCCCTGGGATCTCCAGGGGAAAAAATAAAATT

SphI HindIII

AAAGCATGCA 3'
 TTTCGTACGTTCGA 5'

b)

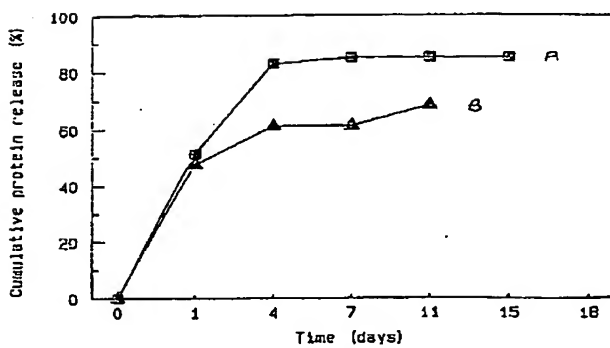
SalI

5' TCGACATTATATTACTAATTAATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTAA
 3' GTAATATAATGATTAATTAACCCCTGGGATCTCCAGGGGAAAAAATAAAATT

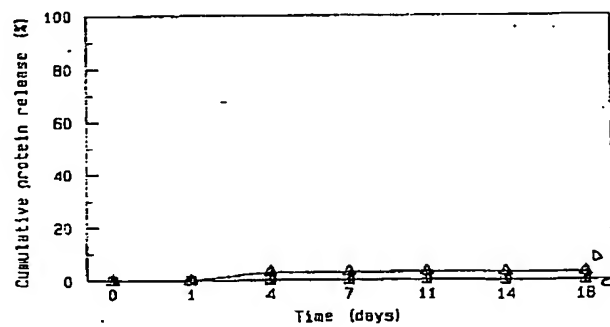
SphI BamHI StyI

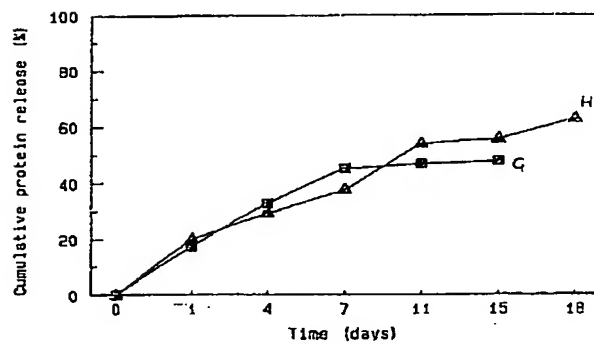
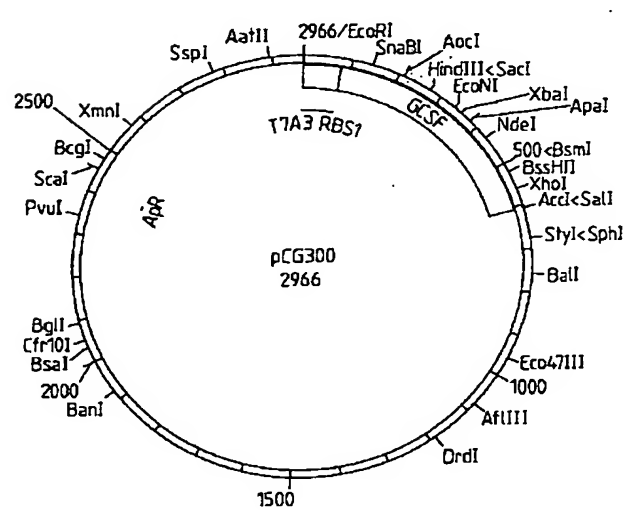
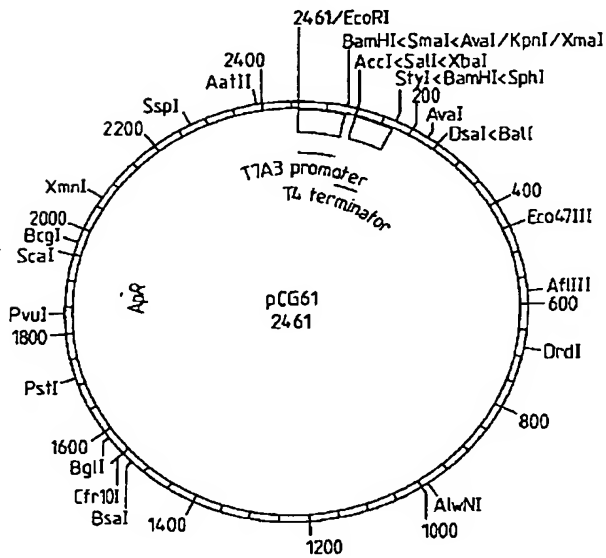
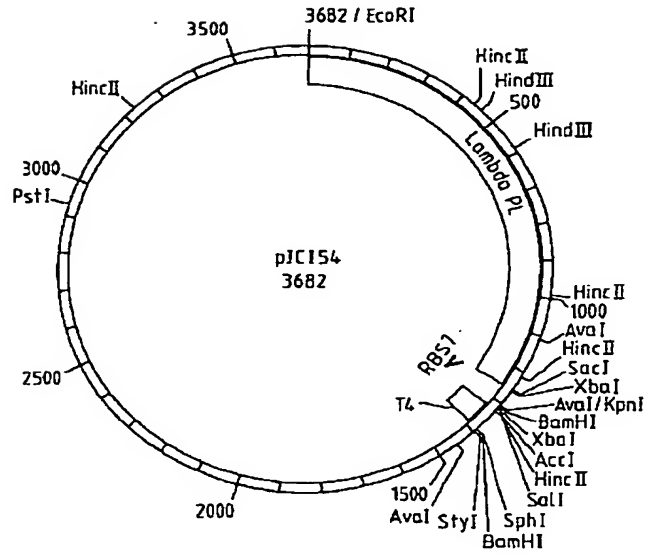
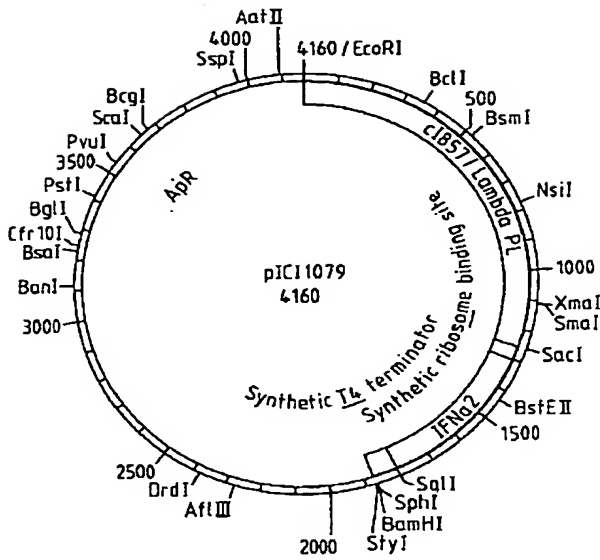
AAAGCATGCGGATCCC 3'
 TTTCGTACGCCTAGGGGAAC 5'

【図13】

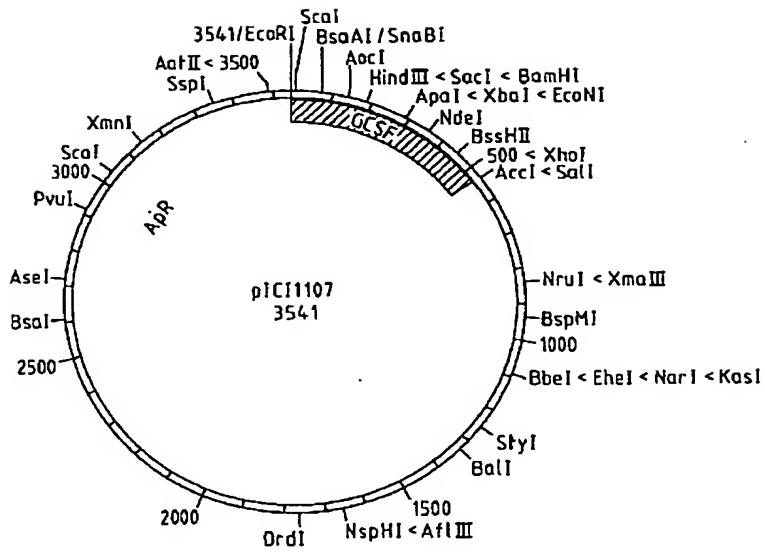


【図14】

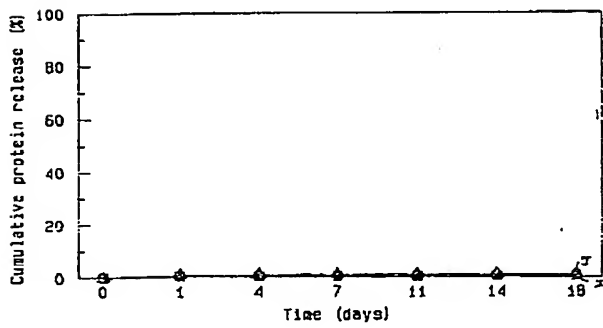




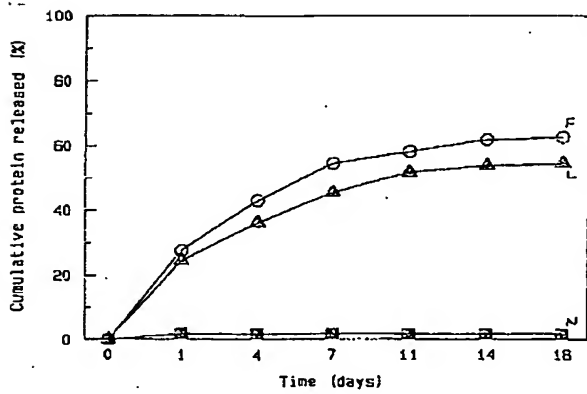
【図11】



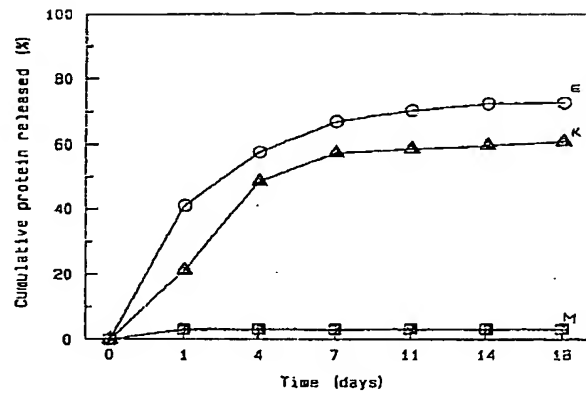
【図16】



【図18】



【図17】



【手続補正書】

【提出日】平成4年8月17日

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

*【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

*【補正内容】

【図1】

EcoRI

AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT 50

GACCGT TTATAAGACT TTA CTGACA ACTGTTAATT AGTAGCTTGA 46

HpaI

AGTTAACTAG TACGCAAGTT CACGTAAAAA GGGTATCGAC 90

TCAATTGATC ATGCGTTCAA GTGCATTTTT CCCATAGCTG 86

KpnI BamHI XbaI SalI PstI SphI

AATGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGTCGAC CTGCAGGCAT GCAAGCTTAG 140

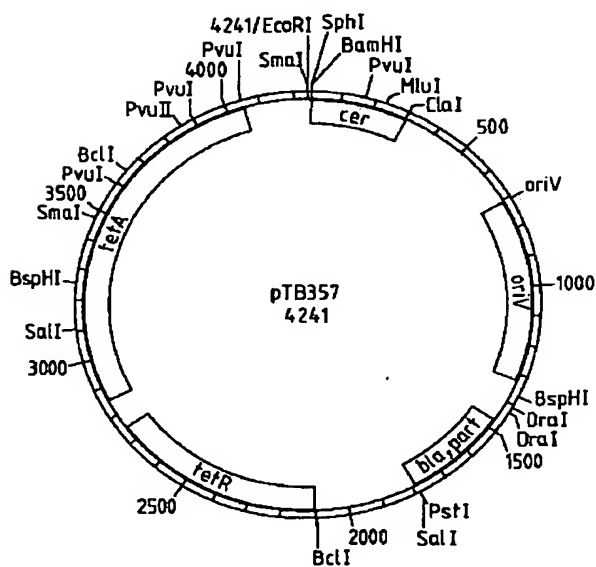
TTACCATGGG CCCCTAGGAG ATCTCAGCTG GACGTCOGTA CGTTCGAATC 136

ClaI

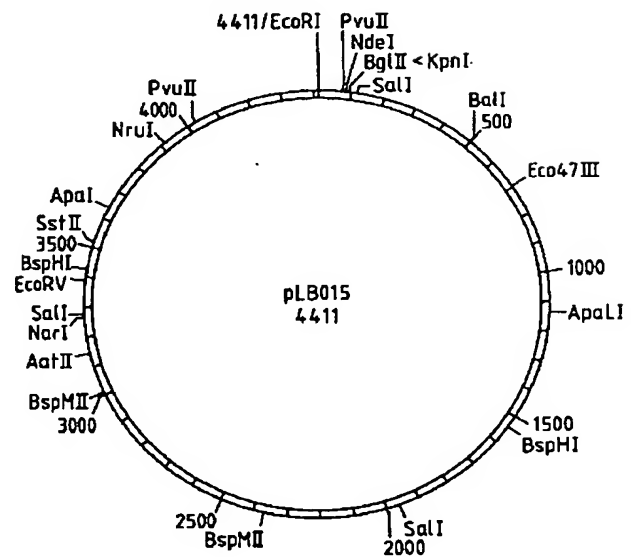
CCCGCCTAAT GAGCGGGCTT TTTTAT 168

GGGCGGATTA CTCGCCGAA AAAAAATAGC 166

【図7】



【図9】



【図2】

EcoRI	ScaI
AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG AAG TGT	59
GTCA TGA GGT GAC CCA GGT CGT TCG AGA GAC GGC GTC AGA AAG GAC GAC TTC ACA	
Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys	15
1	
SnabI	FspI
CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC GAT GGT GCG GCT CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA	119
GAG CTT GTC CAT GCA TTT TAA GTT CCG CTA CCA CGC CGA GAC CTC CTT TTC GAC ACG CGT	
Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala	35
20	
MstII	BamHI
ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG	179
TGG ATG TTT GAC ACG GTG GGA CTC CTT GAC CAC GAC GAG CCA GTG AGA GAC CCC TAG GGC	
Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro	55
40	
SacI	HindIII
TGG GCT CCA CTG AGC TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG	219
ACC CGA GGT GAC TCG AGA ACG GGC AGG GTT CGA AAT GTT GAC CGT CCG ACG AAC TCG GTC	
Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln	75
60	
XbaI	

[図 3]

CTG CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC ATC TCT CCT 299
 GAC GTG AGG CCA GAC AAG GAC ATG GTC CCA GAC GAC GTC CCG TAG AGA GGA
 Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro 95
 80 85 90 NdeI

GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GGT GGC GAC TTC GCT ACT ACC ATA 359
 CTT AAC CCC GGG TGG GAC CTG TGT GAC GAC GTC CAA CCG CTG AAG CGA TGA TGG TAT
 Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile 115
 100 105 110

TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG 419
 ACC GTT GTC TAC CTC CTT GAC CCA TAC CGA GGC CGT GAC GTC GGC TGA GTC CCA CCG TAC
 Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met 135
 120 125 BssHII

CCA GCA TTC GCC TCT GCT TTC CAG CCG CCG GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT 479
 GGT CGT AAG CCG ACA CGA AAG GTC GCC CCG CCG CCA CAA GAC CAA CCG AGG GTA GAA
 Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu 155
 140 145 XhoI Sali

CAG AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CCG GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG TAA G 534
 GTC TCG AAG GAG CTC CAC AGA ATG CCG CAA CAC GCA CTG GAC CCG GTC GGC ATT CAGCT
 Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro 174
 160 165

BcoRI ScaI

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG CTG AAG TCT
 GTCA TGA GGT GAC CCA GGT CGT TCG AGA GAC GGC CTC AGA AAG GAC GAC TTC AGA
 Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Ser
 1 5 10 15 59

Snabi

Idsa

CTC GAA CAG GTA OGT AAA ATT CAA GGC AGC GGT GCG GCT CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA 119
GAG CTT GTC CAT GCA TTT TAA GTT CCG TCG CCA CGC CGA GAC GTC CTT TTC GAC ACG CGT
Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Ser Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala 35

ILJSH

BamHI

ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG 179
TGG ATG TTT GAC ACG CTG GCA CTC CTT GAC CAC GAG CCA GTG AGA GAC CCC TAG GGC
Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro 55
40 45 50

SacI

Hindry

TGG GCT CCA CTG AGC TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG 219
ACC CGA GGT GAC TCG AGA ACG GGC AGG GTT CGA AAT GTT GAC CGT CCG ACG AAC TCG GTC
Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln 75
60 65 70

xbaI

CTG CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG CCT CTA GAA GGC ATC TCT CCT 299

GAC GTG AGG CCA GAC AAG GAC ATG GTC CCA GAC GAC GTC CGA GAT CTT CCG TAG AGA GGA

Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro 95

80 85 90 95

NdeI

【図4】

【図5】

GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA	359
CTT AAC CCC GGG TGG GAC CTG TGT GAC GTC GAC CAA CGG CTG AAG CGA TGA TGG TAT	
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile	115
	100
	105
TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG	419
ACC GTT GTC TAC CTC CTT GAC CCA TAC CGA GGC CGT GAC GTC GGC TGA GTC CCA CGC TAC	
Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met	135
	120
	125
	BssHII
CCA GCA TTC GCC TCT GCT TTC CAG CCG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTC GCC TCC CAT CTT	479
GGT CGT AAG CCG AGA CGA AAG GTC GCC GCG CGT CCG CCA CAA GAC CAA CCG AGG GTA CAA	
Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu	155
	140
	145
	XhoI
CAG AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG TAA G	534
GTC TCG AAG GAG CTC CAC AGA ATG GCG CAA GAC GCA GTG GAC CGG GTC GGC ATT CAGCT	
Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro	174
	160
	165
	170
	Sali

【図6】

TRANSCRIPTION TERMINATION SEQUENCE

a)

SalI

5' TCGACATTATATTACTAATTAATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTAA
 3' GTAATATAATGATTAATTAACCCCTGGGATCTCCAGGGGAAAAAATAAAATT

SphI HindIII

AAAGCATGCA 3'
 TTTCGTACGTTGCA 5'

b)

SalI

5' TCGACATTATATTACTAATTAATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTAA
 3' GTAATATAATGATTAATTAACCCCTGGGATCTCCAGGGGAAAAAATAAAATT

SphI BamHI StyI

AAAGCATGCGGATCCC 3'
 TTTCGTACGCCTAGGGGAAC 5'

【図8】

EcoRI

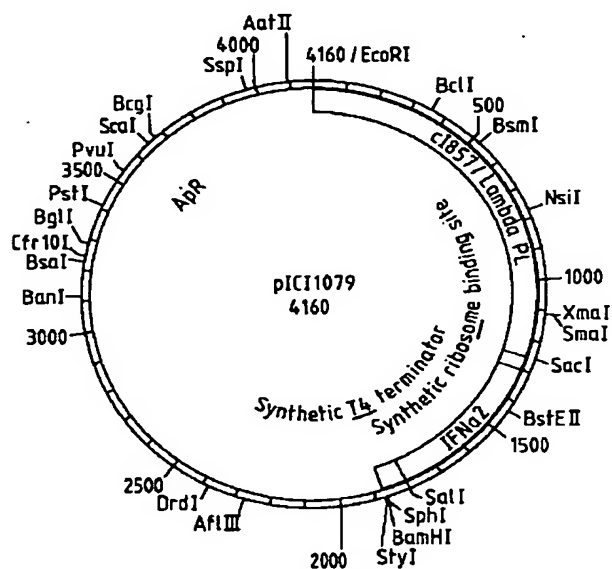
AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGAGCAATTAA TCATCGAACT

HpaI

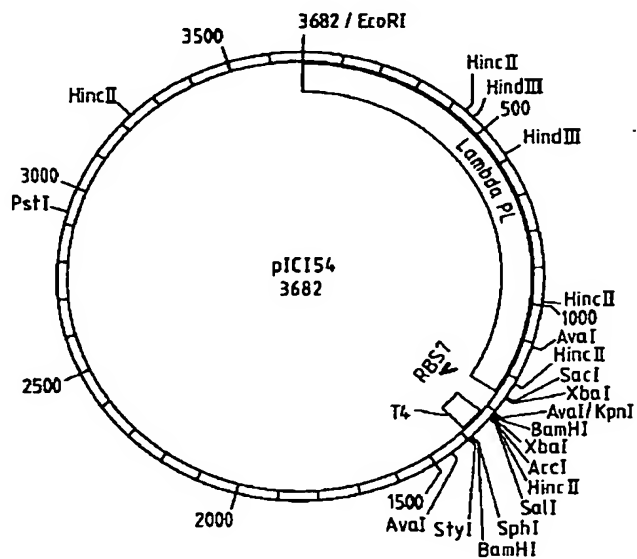
AGTAACTAG TACGCAGAGC TCAATCTAGA GGGTATTAAT AATGTTCCCA

TTGGAGGATG ATTAATG

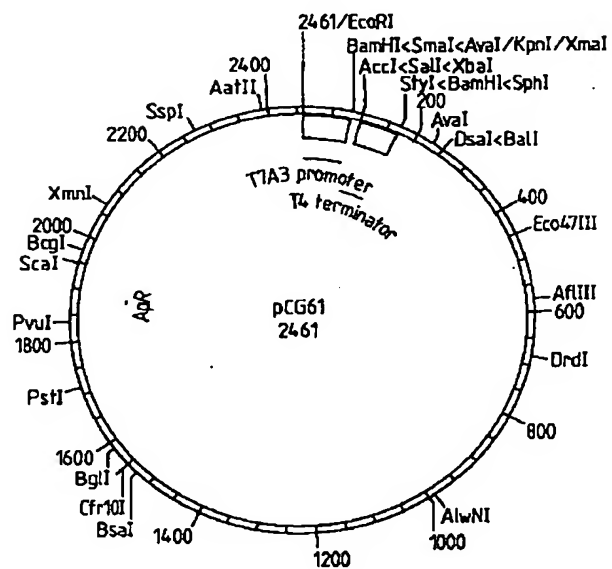
【図10】



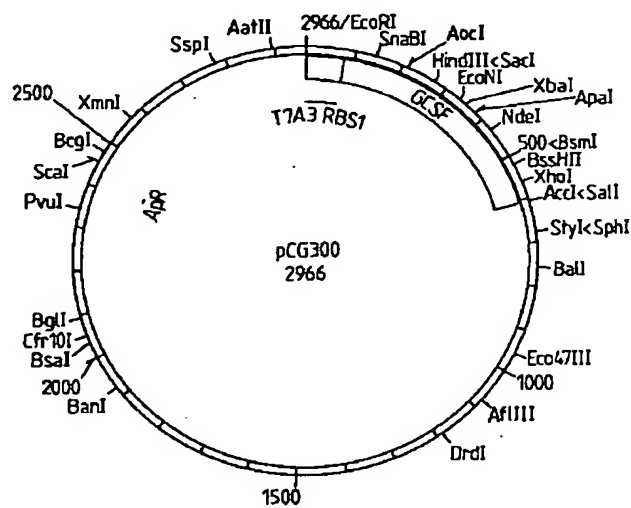
【図11】



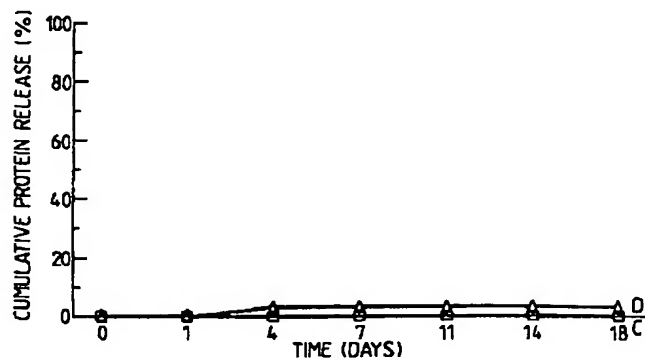
【図12】



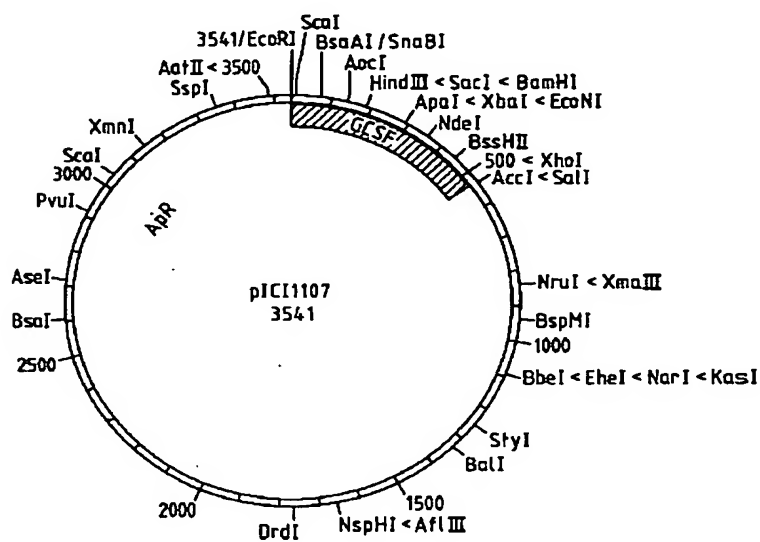
【図14】



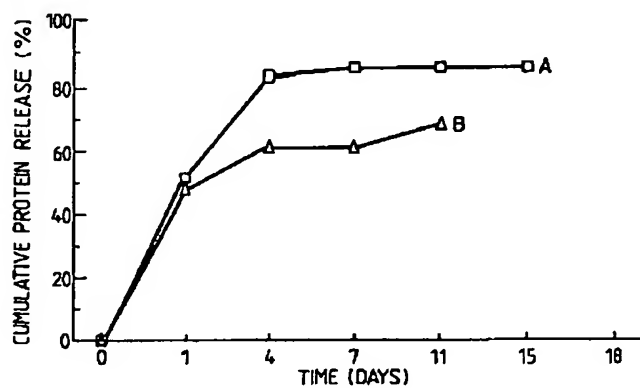
【図16】



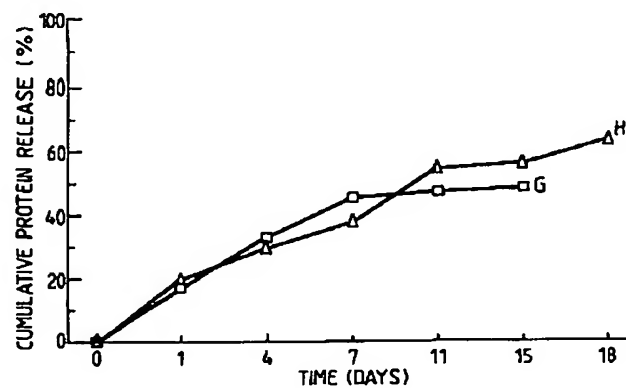
【図13】



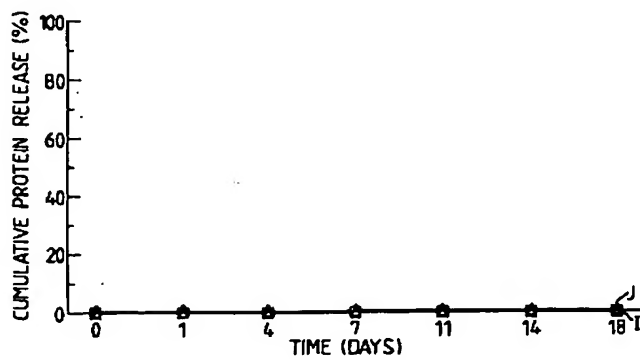
【図15】



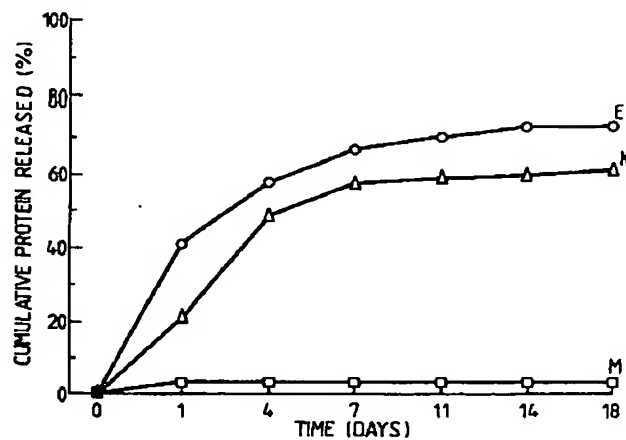
【図17】



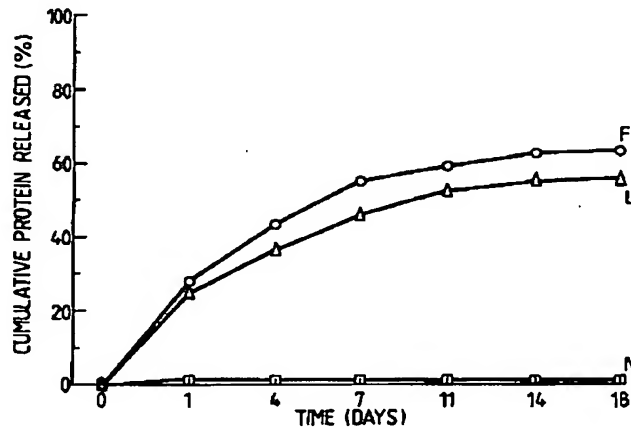
【図18】



【図19】



【図20】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

A61K 47/34
47/48

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

B 7329-4C
B 7329-4C

(31)優先権主張番号 9018416.9
(32)優先日 1990年8月23日
(33)優先権主張国 イギリス (GB)
(31)優先権主張番号 9018417.7
(32)優先日 1990年8月23日
(33)優先権主張国 イギリス (GB)
(31)優先権主張番号 9018418.5
(32)優先日 1990年8月23日
(33)優先権主張国 イギリス (GB)

(72)発明者 ティムス, デービッド
イギリス国, チェシャー, マツクレスフイ
ールド, オールダーレー・パーク (番地そ
の他表示なし)
(72)発明者 ウィルキンソン, アントニー・ジェームス
イギリス国, チェシャー, マツクレスフイ
ールド, オールダーレー・パーク (番地そ
の他表示なし)